263
C.N.R.S.
AO 10978

THESE

DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS XI (ORSAY)

par Mlle Danièle CUMINGE

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

LE ROLE DES GLYCOPROTEINES DANS LE MECANISME DE MIGRATION CHIMIOTACTIQUE DES CELLULES GERMINALES CHEZ L'EMBRYON DE POULET, D'APRES LES RESULTATS D'EXPERIENCES IN VITRO

Soutenue le 15 Mai 1975

Jury : MM. Et. WOLFF,
R. COUTEAUX,
Th. LENDER,
Y. CROISILLE,
Mlle B. SALZGEBER.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542727_0004

C.N.R.S.
AO 10978

THESE

DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L' UNIVERSITE PARIS XI (ORSAY)

par Mlle Danièle CUMINGE

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

LE ROLE DES GLYCOPROTEINES DANS LE MECANISME DE MIGRATION CHIMIOTACTIQUE DES CELLULES GERMINALES CHEZ L'EMBRYON DE POULET, D'APRES LES RESULTATS D'EXPERIENCES IN VITRO

Soutenue le 15 Mai 1975

Jury : MM. Et. WOLFF,
R.COUTEAUX,
Th.LENDER,
Y.CROISILLE,
Mlle B.SALZGEBER.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT-PROPOS

Je suis très heureuse de pouvoir exprimer ma gratitude à mon Maître, le Professeur Etienne WOLFF, Membre de l'Institut, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire d'Embryologie expérimentale.

Je tiens à le remercier, ainsi que Madame WOLFF, pour l'attention bienveillante qu'ils m'ont accordée en m'initiant eux-mêmes aux méthodes de recherches propres au laboratoire, et pour l'affectueuse sollicitude qu'ils m'ont constamment témoignée.

Je suis reconnaissante à Monsieur le Professeur Etienne WOLFF de m'avoir permis de me spécialiser dans les techniques modernes de la microscopie électronique et de l'autoradiographie de haute résolution et de m'avoir confié un poste de responsabilité dans un important service de son Institut.

Bien que j'appartienne au cadre technique, Monsieur WOLFF m'a vivement encouragée à préparer une thèse d'Etat en suscitant, puis en favorisant une collaboration avec Monsieur R. DUBOIS.

J'ai ainsi été amenée à découvrir l'intérêt et les richesses d'une voie de recherche féconde dans laquelle Etienne WOLFF dirigea les efforts de plusieurs de ses élèves.

Je remercie Mr. DUBOIS de m'avoir fait bénéficier de son expérience dans l'étude des mécanismes qui déterminent la mise en place de la lignée germinale dans les ébauches gonadiques, chez l'embryon de Poulet.

La conduite d'un travail expérimental et la réalisation matérielle d'un mémoire de thèse nécessitent les efforts et le dévouement de nombreux collègues : que chacun soit assuré de ma reconnaissance.

Enfin, je remercie vivement Messieurs les Professeurs COUTEAUX et LENDER, Monsieur CROISILLE et Mademoiselle SALZGEBER de s'être intéressés à ce travail et d'avoir bien voulu accepter de participer au jury de ma thèse.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

MATERIEL, METHODES et TECHNIQUES - GENERALITES

I. Techniques de culture et d'incorporations..... 4
II. Techniques histologiques et autoradiographiques..... 6
III. Traitements des données quantitatives..... 8

PREMIERE PARTIE

LA FONCTION EXCRETRICE DES EPITHELIUMS GERMINATIFS

I. Etude morphologique ultrastructurale des épithéliums germinatifs attractifs..... 13
II. Etude dynamique de la fonction excrétrice des épithéliums germinatifs attractifs..... 19
III. Sites d'incorporation et voies de migration intracellulaire de la leucine-^{3}H en culture..... 34
IV. La fonction excrétrice des épithéliums germinatifs : discussion et conclusion..... 48

DEUXIEME PARTIE

BIOSYNTHESE GLYCOPROTEIQUE DANS LES CELLULES EPITHELIALES DES EBAUCHES GONADIQUES

I. Incorporation de galactose tritié, en culture organotypique et rôle des appareils de Golgi..... 53
II. Incorporation de fucose-^{3}H, en culture organotypique et rôle des appareils de Golgi..... 66
III. Synthèse glycoprotéique dans les épithéliums germinatifs. Conclusion générale..... 80

TROISIEME PARTIE

ROLE DES GLYCOPROTEINES DANS LE MECANISME DE MIGRATION CHIMIOTACTIQUE DES CELLULES GERMINALES

I. L'amiboidisme des cellules germinales primordiales. Observations ultrastructurales et histochimiques..... 89

II. Biosynthèse glycoprotéique et activité membranaire dans les cellules germinales..... 93

III. Effet de la Concanavaline A sur la migration des cellules germinales..... 107

CONCLUSION GENERALE..... 118

RESUME..... 123

BIBLIOGRAPHIE..... 131

I N T R O D U C T I O N

L'étude de l'origine et de la mise en place de la lignée germinale chez les Vertébrés, a fait l'objet de nombreux travaux. D'un point de vue strictement descriptif, les différentes étapes de la migration des cellules germinales primordiales (CGP) sont bien connues dans les principaux Groupes. En ce qui concerne les Oiseaux, les travaux de D. SIMON (69) ont permis d'affermir, sur des bases expérimentales sûres, la validité d'observations plus ou moins anciennes, et de réfuter certaines hypothèses explicatives du mécanisme de migration. En exploitant les possibilités variées offertes par la technique des parabioses in vitro, (Et. WOLFF et D. SIMON, 80), cet auteur apporta les preuves de l'existence du "croissant de SWIFT" (70) et de la migration vasculaire des CGP des Oiseaux. De plus, les observations de D. SIMON donnaient à penser que l'installation des CGP dans les épithéliums germinatifs était déterminée par un mécanisme chimiotactique. L'embryon d'Oiseau (Poulet) s'est révélé être un matériel de choix pour aborder ce problème : en mettant à profit les méthodes de culture mises au point et développées par Et. WOLFF et K. HAFFEN (79), R. DUBOIS (24) a démontré la validité de l'hypothèse chimiotactique. Les épithéliums germinatifs exercent une puissante attraction chimiotactique sur les CGP en transit dans la circulation embryonnaire, sur les gonocytes primaires de la gonade morphologiquement indifférenciée, et sur les spermatogonies. Les conditions expérimentales utilisées permettent d'exclure l'explication mécaniste de V. DANTCHAKOFF (18), de même que la "selective contact guidance" proposée par P. WEISS (74).

L'attraction chimiotactique implique d'une part que les épithéliums germinatifs excrètent un facteur diffusible qui crée un champ attractif et d'autre part, que les cellules germinales spécifiquement guidées par ce "champ", effectuent une migration orientée par mouvements amiboïdes. Les problèmes qui se posent sont de deux sortes :

- les épitheliums germinatifs attractifs ont-ils une fonction sécrétrice et excrétrice marquée et, dans l'affirmative, quelle est la nature chimique des substances synthétisées et rejetées par ces organes embryonnaires ?

- quel est le support mécanique des mouvements autonomes des cellules germinales ? Sur quels sites cellulaires les effets de l'attraction chimiotactique s'exercent-ils ?

L'extrême petitesse du matériel que nous nous proposons d'étudier, et plus encore l'impossibilité de prélèvements sélectifs des tissus et cellules embryonnaires de l'ébauche gonadique, interdisent l'accès de ces problèmes par les méthodes classiques de la biochimie. Nous pouvons cependant les aborder par l'emploi des précurseurs radioactifs combiné aux techniques autoradiographiques de haute résolution. En effet il est possible de mettre en évidence l'existence et les modalités topochimiques d'une biosynthèse particulière en utilisant des précurseurs judicieusement choisis pour leurs propriétés chimiques et en analysant du double point de vue morphologique et cinétique, l'évolution du signal radioactif introduit dans le système à étudier. En procédant de cette façon, nous approcherons le domaine biochimique des mécanismes vitaux par une voie indirecte, et sans qu'il soit nécessaire de procéder à la préparation d'extraits purifiés. La méthodologie que

nous avons employée est donc particulièrement précieuse pour l'embryologiste qui le plus souvent, et pour de nombreuses raisons, doit renoncer à l'espoir de travailler sur des fractions pures isolées à partir de populations cellulaires homogènes.

La première partie du présent mémoire est consacrée à l'étude de la fonction excrétrice de l'épithélium germinatif, fonction qui a pu être mise en évidence par l'emploi de Leucine-^{3}H. Puis nous décrirons, dans la seconde partie, les principales expériences qui nous ont permis, par la mise en oeuvre du Galactose-^{3}H et du Fucose-^{3}H, de démontrer que les épithéliums germinatifs attractifs biosynthétisent et excrètent des complexes de nature glycoprotéique. Dans la troisième partie, nous étudierons les modalités d'incorporation et de renouvellement de ces mêmes traceurs dans les cellules germinales et nous présenterons des résultats qui précisent le rôle essentiel joué par les glycoprotéines dans les mécanismes de migration de ces cellules.

En choisissant de donner un développement plus important aux descriptions morphologiques et dynamiques (sites d'incorporation des précurseurs, migrations des macromolécules néosynthétisées, comportement des cellules germinales.....), nous avons souhaité dégager la part qui nous est la plus personnelle dans une recherche faite en collaboration avec R. DUBOIS. Ceci ne va pas sans quelques inconvénients. En effet, nos protocoles expérimentaux ont été préparés de telle sorte que la théorie des pools en équilibre dynamique stationnaire (R. SCHOENHEIMER, 68 ; D.B. ZILVERSMIT et all., 82), sur laquelle nous reviendrons plus loin, puisse être facilement appliquée à l'analyse de nos résultats quantitatifs. Car, en toute

rigueur, nous devons admettre que l'idée de "déplacements" des grains d'argent d'un site subcellulaire à un autre procéde d'une appréciation subjective. Ces "déplacements" ne prouvent pas à eux seuls les migrations de macromolécules marquées : ils suggèrent tout au plus la possibilité de migrations. Une preuve plus convaincante, - et parfois formelle - , de l'existence de transferts, doit nécessairement s'appuyer sur des considérations d'ordre cinétique. Par cet exemple précis, nous voulons souligner qu'il importe de vérifier si les conditions d'un transfert sont quantitativement satisfaites dans les coordonnées d'espace et de temps imposées par le matériel expérimental. Si les résultats de l'analyse cinétique sont incompatibles avec l'hypothèse d'un transfert d'activité entre les sites regardés comme source et comme but, cette hypothèse doit être rejetée. Nous devrons donc indiquer brièvement, à chaque fois que cela sera nécessaire, que telle interprétation trouve sa pleine justification dans l'intégration des données morphologiques et cinétiques, renvoyant le lecteur aux mémoires originaux pour le détail des démonstrations.

MATERIEL, METHODES et TECHNIQUES - GENERALITES

Les méthodes et détails techniques propres à chaque type d'expérience seront rapportés aux paragraphes correspondants. Nous ne traiterons ici que des généralités.

I. - TECHNIQUES de CULTURE et d'INCORPORATIONS.

Les expériences sont faites sur l'embryon de Poulet de la race Leghorn blanche ayant atteint le stade de 32 à 35 paires de somites (environ 3 jours d'incubation). Cet embryon est représenté sur la figure 1 de la Planche I.

1.) Milieux de culture. Les expériences comportent toujours deux phases : la phase d'incorporation du traceur et la phase de chasse durant laquelle l'explant poursuit son évolution en présence de précurseur non-radioactif. En règle générale, les expériences de chasse dont la durée dépasse plusieurs heures (cultures de blastodermes, notamment) sont conduites sur le milieu de Et. WOLFF et K. HAFFEN (79) ; pour les phases d'incorporation, et pour les phases de chasse de courte durée (par exemple 1 ou 2 heures), le milieu de culture est un milieu de Et. WOLFF et K. HAFFEN pour lequel l'extrait d'embryon a été supprimé. Sa composition est alors, en respectant les proportions et concentrations indiquées par ces auteurs : gélose + tyrode + précurseur (radioactif ou non radioactif).

2.) Matériel expérimental et techniques d'incorporation. Pour une série expérimentale donnée, les embryons sont choisis aussi semblables que possible du point de vue de leur stade (32 paires de somites par exemple). S'il s'agit de culture de blastodermes, leurs surfaces devront être, de plus, égales. Les cultures organotypiques portent sur les régions gonadiques prélevées entre les 22e et 30e somites ou sur des tranches transversales (épaisseur d'environ 2 somites) de ces mêmes régions (Pl. I, fig. 2). Les blastodermes et les régions gonadiques ne sont jamais explantés et transplantés directement sur les milieux de culture. L'expérience d'incorporation commence avec leur immersion dans le liquide de Tyrode contenant le précurseur radioactif à la même concentration que celle du milieu. C'est à partir de ce premier milieu liquide d'incubation

que l'explantation aura lieu . De même, l'expérience de chasse débute avec l'immersion de l'explant dans le liquide de Tyrode contenant le précurseur non radioactif (opération de lavage et de dilution du traceur non incorporé) et c'est à partir de ce milieu liquide que la transplantation sur le milieu gélosé sera effectuée. En procédant de la sorte, la culture in vitro permet d'obtenir un découpage précis de la durée de culture en présence de précurseur et une bonne résolution du signal radioactif injecté dans le système dans le cas de courts "pulses" d'incorporation. Moyennant ces précautions et en travaillant dans une chambre isotherme (38,5°C), l'expérimentateur maîtrise correctement le déroulement de l'expérience, surtout lorsque cette dernière porte sur des temps courts. L'analyse statistique confirmera l'homogénéité des échantillons expérimentaux et en donnera la mesure. Rappelons enfin que la concentration en précurseur froid dans le milieu de chasse doit être beaucoup plus importante que celle du traceur dans le milieu d'incorporation. Lorsque l'expérience de chasse se prolonge plusieurs heures, les explants sont lavés et transplantés sur des milieux non contaminés. Nous améliorons ainsi les conditions d'irréversibilité globale dans le système.

II. - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES et AUTORADIOGRAPHIQUES.

1.) Histologie et autoradiographie optiques. Les échantillons radioactifs sont fixés par l'alcool acétique (alcool éthylique 95° : 3 vol. ; acide acétique glacial ; 1 vol.) ou par le liquide de Bouin. Les préparations autoradiographiques sont réalisées selon la technique de L.G. CARO (10). Après déparaffinage, les

coupes sont soumises à l'action ménagée du PCA (2,5 % à 5°C pendant 30 mn ou 5 % à 5°C. pendant 1 heure) afin d'éliminer les petits polypeptides et le précurseur libre. Après rinçage les coupes sont plongées dans l'émulsion K_5 de Ilford diluée des 2/3 par l'eau distillée. Le temps d'exposition est de 12 à 15 jours. La réaction autoradiographique est révélée par le Microdol X (Kodak) et fixée par le thiosulfate de sodium à 25 %. Les coupes sont colorées par l'hématoxyline-éosine ou le glychémalun. Quelques autoradiographies optiques sont réalisées sur les coupes semi-fines après fixation au tétroxyde d'osmium et inclusion à l'épon (microscopie électronique). Ces témoins sont lus au microscope à contraste de phase.

2.) Histologie et autoradiographie de haute résolution.

Les régions gonadiques sont fixées pendant 45 minutes dans le tétroxyde d'osmium froid (4°C) à 1% dans le tampon phosphate (pH 7,5), déshydratées puis incluses dans l'épon. Les coupes argentées obtenues à l'ultramicrotome Reichert sont déposées sur les lames de verre préalablement collodionnées (collodion à 0,5 % dans l'acétate d'isobutyle). Les coupes traitées par une double coloration : acétate d'uranyle (5%) et citrate de plomb (E.S. REYNOLDS, 66), sont ensuite carbonées. Les traitements autoradiographiques sont réalisés selon la technique de Ph. GRANBOULAN (41) légèrement modifiée. L'émulsion L_4 de Ilford diluée 5 fois par l'eau bidistillée est homogénéisée pendant 60 minutes à 40°C. Refroidie à 0°C. pendant 2 heures, elle est portée à 45°C. en 45 minutes. L'émulsionnage des coupes se fait à 45°C. Après un séchage préalable, les lames sont rangées dans des boîtes étanches contenant de l'anhydride phosphorique comme dessicateur. L'exposition est de 8 semaines à 4°C. La

réaction autoradiographique est révélée par le Microdol X à 18°C. pendant 4 minutes et fixée par le thiosulfate de sodium à 25%, à 24°C. pendant 5 minutes. Les coupes sont examinées aux microscopes électroniques Hitachi H S 7 S et H U 11 A.

3.) Mesure de la radioactivité. Les nombreuses photographies prises au hasard dans des endroits divers des différents épithéliums germinatifs radioactifs permettent de mesurer la radioactivité dans le matériel expérimental et de déterminer la validité statistique de cette mesure. Les données quantitatives sont exclusivement établies à partir des documents qui présentent une grande homogénéité du point de vue de l'état des structures et de la qualité de l'image autoradiographique. Les dimensions absolues et relatives des différents compartiments cellulaires sont estimées par pesées après découpages, et la radioactivité spécifique à chacun d'eux est exprimée en nombre de grains d'argent par unité de surface (100 μ^2).Puisque nous nous occupons essentiellement des processus cinétiques qui gouvernent l'évolution globale de la radioactivité en fonction du temps, nous attribuerons indifféremment à cette mesure les expressions : radioactivité spécifique, concentration de la radioactivité, concentration en grains d'argent, densité granulaire.

III. - TRAITEMENTS des DONNEES QUANTITATIVES (Tableaux numériques et représentations graphiques).

1.) Validité statistique des résultats. L'analyse statistique des données numériques a montré que la variabilité des mesures provient plutôt des fluctuations dues aux techniques autoradiographiques qu'aux variations individuelles des tissus qui incorporent

le précurseur dans les conditions expérimentales précisées ci-dessus (R. DUBOIS et D. CUMINGE, 29). En d'autres termes, il a été vérifié que la dispersion statistique des résultats obtenus à partir d'embryons différents n'est pas plus importante que celle des résultats obtenus sur des autoradiographies différentes issues du même embryon. Pour cette raison, les fragments de régions gonadiques fixés à un temps donné sont prélevés au hasard et les coupes ultrafines sont également pratiquées au hasard dans cet échantillon,à différents niveaux de chaque fragment. Le nombre d'autoradiographies par explant varie de 5 à 8. Les écarts-types sont calculés en tenant compte du nombre d'autoradiographies. Mais l'erreur standard de la moyenne et l'intervalle de confiance de cette moyenne (pour un coefficient de sécurité de 99%) sont calculés en tenant compte, pour plus de rigueur, du nombre de fragments, c'est-à-dire du nombre de cas. Selon les séries expérimentales, nous indiquerons la déviation standard ou l'intervalle de confiance de la moyenne, mais en le précisant à chaque fois explicitement.

2.) Rappel méthodologique sur l'exploitation cinétique des données quantitatives. (Etude de la variation de la densité en grains d'argent en fonction du temps). L'interprétation cinétique des résultats est basée sur la théorie des pools biologiques en équilibre dynamique, maintenus en état stationnaire par un processus de renouvellement constant (R. SCHOENHEIMER,68 ; D.B. ZILVERSMIT et all., 82). De nombreux domaines de la physiologie ont été abordés avec succès par cette méthode (F. MOREL et J. MAETZ, 53).

La synthèse de nouvelles molécules radioactives spécifiquement adaptées à l'étude de métabolismes particuliers, a permis d'étendre son domaine d'application à certains systèmes biologiques : renouvellements des ARN et de diverses protéines, mise en évidence de phénomènes sécrétoires. Nous rappellerons brièvement et en omettant les justifications mathématiques, que cette méthodologie permet, dans des conditions expérimentales judicieusement choisies, de décrire l'état dynamique d'un pool macromoléculaire en mesurant l'intensité relative des processus métaboliques qui s'y déroulent. Il est également possible de vérifier l'existence de transferts de biomolécules entre différents pools, ou entre différents compartiments cellulaires, et de préciser l'importance quantitative de ces flux : l'expérimentateur a ainsi, par l'emploi de cet outil remarquable, les moyens de contrôler la validité d'une hypothèse sur un transfert lorsque les observations morphologiques suggèrent l'existence d'un transit de produits de synthèse. Le domaine de validité de la théorie est cependant limité par des simplifications et des critères de base que l'expérimentateur admet implicitement ou s'impose arbitrairement. En ce qui concerne les systèmes biologiques anatomiquement cloisonnés (organes, populations de cellules ou d'organites...) il importe de noter que les processus cinétiques mis en évidence ne sont généralement valables qu'à l'échelle des bilans globaux dans l'ensemble de l'organe, et non à l'échelle des unités fonctionnelles. Ceci est dû au fait que, dans son principe même, la théorie se propose une description du continu alors que les entités biologiques travaillent le plus souvent de façon rythmique. Dans notre matériel expérimental, il

a été précisément démontré que l'extrapolation des résultats cinétiques à l'échelle de chaque unité fonctionnelle est interdite (R. DUBOIS, 26) ; mais cette restriction n'entache nullement la validité de conclusions qui précisent, en termes qualitatifs, les évènements d'ordre topochimique propres à chaque cellule, ainsi que nous le verrons au cours de cet exposé (Seconde Partie).

PREMIERE PARTIE

LA FONCTION EXCRETRICE des EPITHELIUMS GERMINATIFS

I. - ETUDE MORPHOLOGIQUE ULTRASCTRUCTURALE des EPITHELIUMS GERMINATIFS ATTRACTIFS.

L'hypothèse d'un chimiotactisme positif étant vérifiée, le problème de la physiologie excrétrice des épithéliums germinatifs se trouve posé, de même que celui de la nature des substances élaborées par ces organes embryonnaires.

1.) Aspect morphologique des épithéliums germinatifs.

Les épithéliums germinatifs sont surtout remarquables par leur aspect syncytial et dissocié : les membranes plasmiques latérales sont parfois absentes et souvent discontinues. Du côté proximal, la membrane basale est détruite ou n'est représentée que de façon fragmentaire (Pl. I, fig. 4). Par contre, le pôle distal des cellules (tourné vers la cavité coelomique) est limité par une membrane plasmique nette. La différenciation de barres terminales et de desmosomes assure la solidité de l'épithélium (Pl. I, fig. 4 ; Pl. II, fig. 8 ; Pl. III, fig. 13 et 18). Nous nous sommes demandé si l'aspect dissocié de l'épithélium, et l'absence de membrane basale bien constituée ne sont pas dus à l'activité lytique et phagocytique des cellules germinales. Cette hypothèse est insuffisante pour les raisons suivantes :

- chez un embryon de 32 paires de somites, précocement stérilisé par irradiation des CGP dans le croissant germinal (R. DUBOIS, 23), les épithéliums germinatifs demeurent de type syncytial et dissocié et la membrane basale ne se constitue pas intégralement.

P L A N C H E I

Description du matériel d'expérience.

Figure 1 : Embryon de 3 jours d'incubation (stade de 32 paires de somites). (x 1,75).

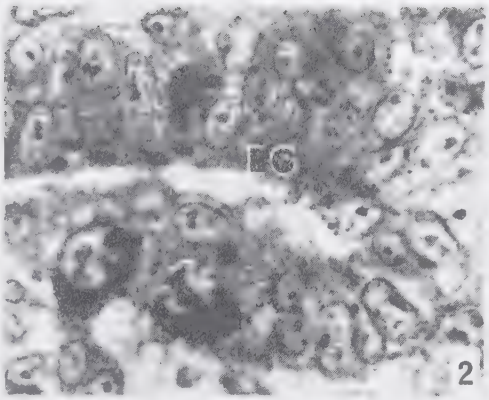
Figure 2 : Aspect d'un épithélium germinatif au stade de 32 paires de somites. Les cellules germinales (CGP) installées dans l'ébauche gonadique sont aisément identifiables grâce à leur grande richesse en complexes lipidiques colorés par le Noir Soudan (x 1000).

Figure 3 : Aspect d'une jeune gonade morphologiquement indifférenciée du 5e jour de l'incubation. Les complexes lipidiques cytoplasmiques (liposomes) sont encore abondants dans les gonocytes primaires (x 1000).

Figure 4 : Epithélium germinatif d'un embryon de 3 jours d'incubation, au microscope électronique. Remarquer l'aspect syncytial et dissocié de l'épithélium (EG) et l'absence de membrane basale. Au niveau de la pénétration de la CGP, l'organisation ultrastructurale de l'épithélium est très perturbée. Noter la différenciation de barres terminales et de desmosomes au pôle apical des cellules (x 3 900).

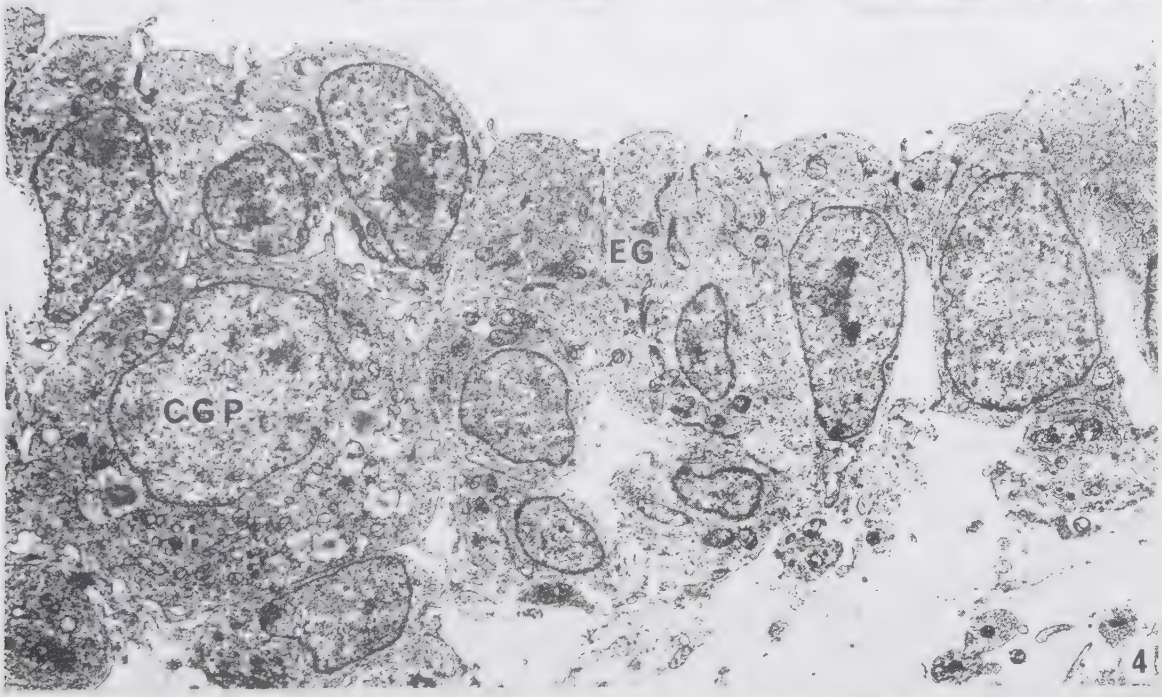
Figure 5 : Epithélium germinatif d'un embryon de 3 jours d'incubation, mais précocement stérilisé par irradiation des CGP dans le croissant germinal antérieur. L'aspect demeure de type syncytial ; cependant, la structure épithéliale est moins perturbée. Membrane basale plus richement représentée ⟶ (x 3 900).

1

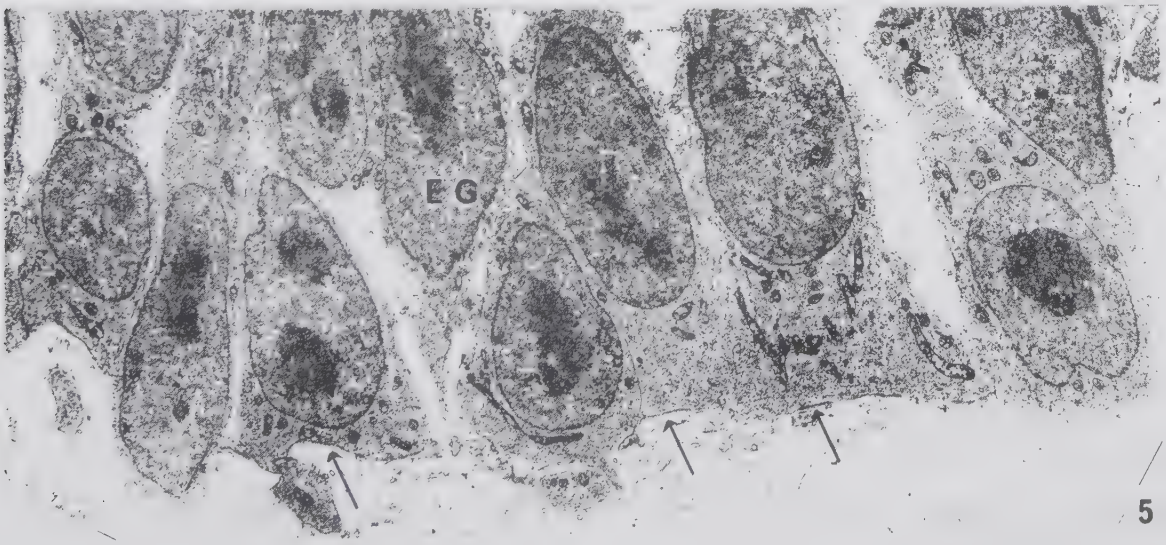


2

3



4



5

Toutefois, la membrane basale de l'embryon stérile est plus richement représentée comparativement à celle de l'embryon normal (Fig. 5, Pl. I) : cette différence est vraisemblablement due à une action lytique exercée par les CGP qui envahissent l'ébauche gonadique (cf. 3e Partie, p. 89 et 97).

- chez un embryon de même stade, l'épithélium coelomique de la région cardiaque est mieux organisé et montre une membrane basale continue.

- chez un embryon de 4 jours 1/2 d'incubation, l'épithélium de la région gonadique montre des membranes plasmiques nettes et une membrane basale organisée.

- enfin, chez un embryon de 19 paires de somites, les épithéliums de la future région gonadique ne montrent pas ou peu de membrane basale, alors que les CGP n'ont pas encore atteint les ébauches génitales à ce stade. De plus, on voit les cellules épithéliales émettre des protrusions, ou boursouflures, qui font saillie dans l'espace séparant les feuillets méso- et endodermique (Pl. II, fig. 6). Quelques images suggèrent que la poussée des boursouflures empêche la membrane basale de s'organiser (Pl. II, fig. 7). Les boursouflures se forment également au pôle distal (apical) des cellules (Pl. II, fig. 8). L'ensemble de ces observations nous a amené à rejeter l'hypothèse selon laquelle l'aspect dissocié des épithéliums serait dû exclusivement à l'activité lytique des CGP. L'aspect syncytial et dissocié serait une propriété intrinsèque des épithéliums germinatifs liée, au moins en partie, à une fonction excrétrice. Le fait que l'épithélium de la région gonadique d'un embryon de 4 jours 1/2 présente une ultrastructure régulière et une membrane basale bien organisée est un argument en faveur de cette hypothèse : nous savons que les épithéliums germinatifs com-

P L A N C H E I I

Description du matériel d'expérience (suite)

Figure 6 : Epithélium de l'ébauche gonadique présomptive d'un embryon de 19 paires de somites, avant l'arrivée des CGP. Nombreuses boursouflures (b) au pôle basal des cellules épithéliales ; absence de membrane basale. Remarquer la présence d'une membrane basale au niveau de l'endoderme embryonnaire (end).(x 6200).

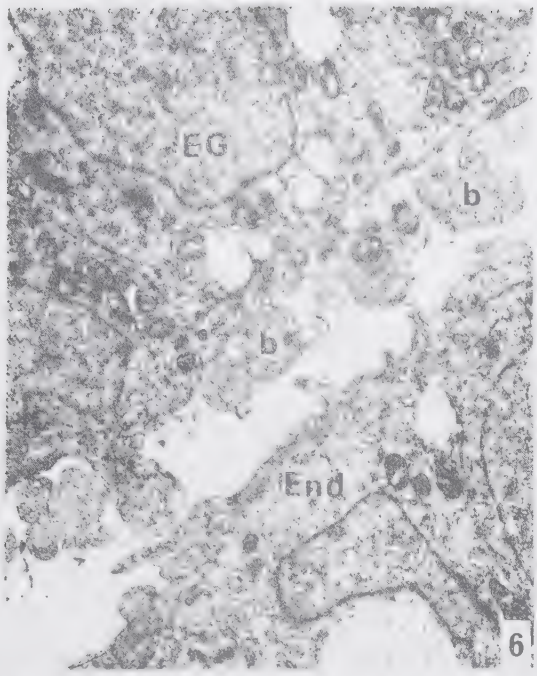
Figure 7 : Même stade que précédemment. Côté basal de l'épithélium germinatif présomptif : rudiments de membrane basale et protrusion de matériel cytoplasmique (x 9800).

Figure 8 : Pôle distal d'une cellule de l'épithélium germinatif d'un embryon de 3 jours d'incubation. Une boursouflure à contenu dense et particulaire (b) de nature ribosomiale fait saillie dans le coelome ; bt = barre terminale (x 9800).

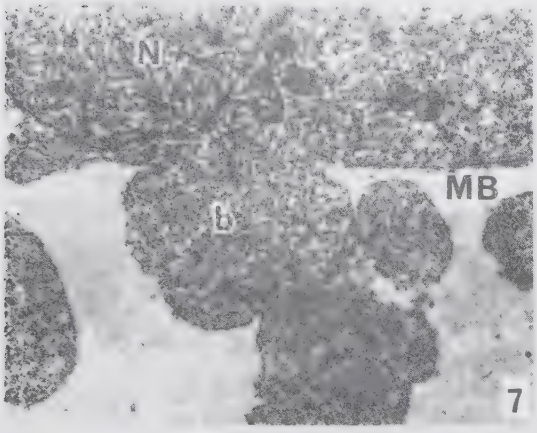
Figure 9 : Détail du pôle distal d'une cellule épithéliale exceptionnellement riche en ergastoplasme granulaire (eg). Incorporation de leucine-^{3}H. f = filaments. (x 16 000).

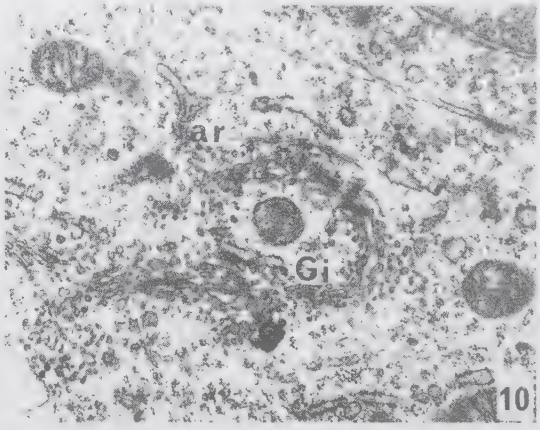
Figure 10 : Appareil de Golgi (Gi) et arrangements ribosomiaux (ar) dans une cellule épithéliale (x 16 000).

Figure 11 : Arrangements ribosomiaux. Ces chaînes polyribosomiales délimitent des zones cytoplasmiques denses aux électrons, au niveau desquelles les synthèses protéiques sont particulièrement intenses. L = lipides figurés. (x 18 500).

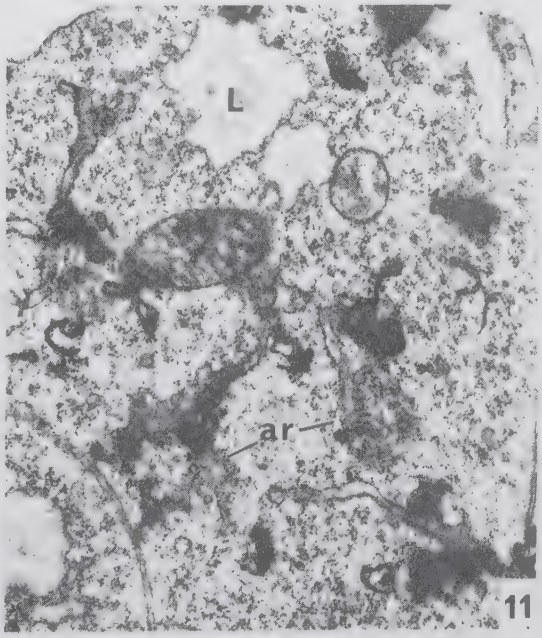

EG
b
b
End
6

m
f
eg
N
9


N
MB
b
7


ar
Gi
10

b
bt
8


L
ar
11

mencent à perdre leur pouvoir attractif au cours du 5e jour de l'incubation (R. DUBOIS, 24 ; G. REYNAUD, 65).

2.) Caractères ultrastructuraux des cellules épithéliales des ébauches gonadiques. Les noyaux, de forme allongée, sont toujours bien délimités par une membrane nucléaire nette. Le cytoplasme est riche en ribosomes libres ou associés en rosettes. Il est fréquent d'y rencontrer des chaînes ribosomiales plus ou moins contournées, qui délimitent une zone cytoplasmique dense aux électrons (Pl. II, fig. 11). Ces structures ont été décrites par G. DALLNER et all. (17) comme étant des coupes tangentielles de l'ergastoplasme granulaire. Sans rejeter définitivement cette interprétation, nous pensons qu'il s'agit plus vraisemblablement de structures polysomiales non liées au reticulum, délimitant des zones de cytoplasmes dans lesquelles les synthèses sont particulièrement intenses (O. BEHNKE, 1). L'ergastoplasme granulaire est relativement peu représenté. La figure 9 (Pl. II) montre cet ergastoplasme dans une région cytoplasmique qui en est exceptionnellement riche. L'ergastoplasme agranulaire se présente fréquemment sous la forme d'un réseau serré de canalicules qui, d'après une interprétation de A. RAMBOURG et M. CHRETIEN (62), correspondrait à un réseau tubulaire collecteur entre l'ergastoplasme granulaire et la face de formation des dictyosomes. L'appareil de Golgi occupe une position variable dans le corps cellulaire : il peut apparaître sous forme de systèmes sacculaires et vésiculaires très développés qui bordent le noyau (Pl. V, fig. 25) ; mais le plus souvent, il consiste en dictyosomes moins étendus, distribués au hasard dans le cytoplasme (Pl. II, fig. 10). Les mitochondries à crêtes bien différenciées sont dispersées dans le cytoplasme. Il ne semble donc pas qu'il y ait une polarité des cellules épithéliales pour un organite particulier. De même, les épithéliums germi-

natifs ne montrent pas de polarité physiologique puisque l'attraction des cellules germinales se fait aussi bien du côté basal (développement normal) qu'au pôle apical (conditions expérimentales).

3.) Le problème des boursouflures. L'hypothèse d'une fonction excrétrice des épithéliums germinatifs nous a conduit à porter notre attention sur la question des boursouflures cellulaires. Chez un embryon de 32 à 35 paires de somites, les boursouflures sont aisément reconnaissables du côté distal. Elles apparaissent sous forme d'extrusions de cytoplasme qui font saillie dans le coelome. Ces extrusions peuvent prendre des aspects variés : boursouflures à contenu dense, riches en inclusions particulaires de nature vraisemblablement ribosomiale (Pl. II, fig. 8), boursouflures claires montrant de petites vésicules (Pl. III, fig. 12, 15 et 17). Ces boursouflures ne contiennent ni réticulum endoplasmique, ni mitochondries. En éclatant, elles déversent leur contenu dans le coelome (Pl. III, fig. 17 et 18), et cette excrétion s'accompagne fréquemment d'un processus de cicatrisation par le jeu de microvésicules alignées à la base des boursouflures (Pl. III, fig. 17 et 18). Du fait de dispositions anatomiques défavorables et de l'absence de processus cicatriciels, les boursouflures qui se forment à la base des épithéliums à ce stade sont plus difficiles à mettre en évidence qu'aux stades plus jeunes. Il est vraisemblable qu'elles nuisent à l'organisation de la membrane basale et que les produits cellulaires ainsi rejetés sont éliminés au fur et à mesure par la circulation sanguine.

4.) Conclusion. L'aspect syncytial et dissocié des épithéliums germinatifs est dû non seulement à l'activité lytique des CGP qui les colonisent (cf. page 15) mais également à des propriétés

excrétrices. Il est remarquable que par leur aspect lâche et leur membrane basale dissociée, les épithéliums germinatifs, contrairement aux épithéliums voisins au même stade, apparaissent être une cible facile à une invasion cellulaire. Il est intéressant de signaler, à ce sujet, une observation faite par C. LE LIEVRE,et N. LE DOUARIN (47). D'après ces auteurs, la désintégration de la membrane basale aux bords latéraux de l'ébauche épithéliale thyroïdienne marque le début de l'invasion de cette ébauche par les cellules du mésenchyme pharyngien, au 6e jour de l'incubation de l'embryon de Poulet. Sur le plan morphologique ultrastructural, les cellules épithéliales de l'ébauche gonadique n'ont pas de caractères typiques de cellules excrétrices. Toutefois, le phénomène de boursouflures, lié à l'aspect dissocié des épithéliums attractifs, suggère fortement l'existence d'une fonction excrétrice de type holo-mérocrine, l'hypothèse d'une diffusion de produits de synthèse à travers la membrane plasmique ne pouvant être écartée.

II. - ETUDE DYNAMIQUE de la FONCTION EXCRETRICE des EPITHELIUMS GERMINATIFS ATTRACTIFS.

Les boursouflures sont-elles de simples extrusions cellulaires ? Ou bien, en dépit de leur ressemblance avec le cytoplasme du corps cellulaire, sont-elles en relation avec une activité spécialisée de la cellule épithéliale ? Ne représentent-elles pas un processus d'élimination de produits élaborés par le corps cellulaire ? L'étude autoradiographique de la migration de la leucine-^{3}H après une courte incorporation devrait permettre de répondre à ces questions.

1.) Protocole expérimental. Les blastodermes sont

cultivés pendant 15 minutes selon la technique de Et. WOLFF et D. SIMON (80) sur un milieu contenant la leucine-^{3}H à la concentration de 200 µCi/ml (soit environ 1 µg/ml). Le précurseur employé est la L-leucine-^{3}H-4-5, Section des Molécules Marquées, SACLAY ; A.S. : 25 Ci/mmole. Après un lavage de 2 minutes dans une solution de tyrode contenant 100 µg par ml de leucine non radioactive, les blastodermes sont transplantés sur des milieux enrichis en L-leucine non radioactive, à la concentration de 50 µg/ml de milieu. Les fixations ont lieu au cours de l'expérience de chasse. Les échantillons sont préparés pour une étude autoradiographique selon les techniques indiquées plus haut. Nous admettrons que dans ces conditions de préparation, le marquage correspond aux macromolécules protéiques ayant incorporé le précurseur.

2.) Migration de la radioactivité liée à la leucine tritiée dans ces conditions expérimentales. Etude principalement limitée aux boursouflures.

Pendant les 15 minutes d'incorporation, les grains apparaissent dans le cytoplasme, l'ergastoplasme granulaire, les mitochondries, l'appareil de Golgi, les noyaux et les nucléoles. D'une façon générale, la grande majorité des boursouflures ne montrent pas de réaction autoradiographique (Pl. III, fig. 12).

Après 15 minutes de chasse, la plupart des boursouflures demeurent non radioactives et le cytoplasme périphérique tend à se démarquer (Pl. III, fig. 13). Les grains d'argent disparaissent donc du pôle distal de la cellule et de la membrane plasmique apicale, et se concentrent dans une zone interne périnucléaire et dans la zone golgienne.

Après 60 minutes d'expérience (45 mn de chasse), la radioactivité apparaît de nouveau à la périphérie de la cellule et gagne le pôle distal et les boursouflures (Pl. III, fig. 14). Dans quelques cas particulièrement favorables (Pl. III, fig. 15) on voit que la réaction autoradiographique marque les boursouflures en train de se former, alors que les boursouflures plus anciennes ne sont pas radioactives. Ainsi, en culture de blastodermes, un délai d'environ 1 heure après l'introduction de la leucine tritiée est nécessaire pour que les boursouflures néoformées (de seconde génération) soient alimentées par du matériel radioactif.

Quatre-vingt dix minutes après le début de l'incorporation, la grande majorité des boursouflures montrent une intense réaction autoradiographique (Pl. III, fig. 16). Par la suite, les produits radioactifs sont déversés dans le coelome par éclatement des boursouflures à la surface des cellules (Pl. III, fig. 17). On voit qu'après un temps de chasse suffisant (de l'ordre de 3 à 5 heures dans ces conditions expérimentales), les boursouflures les plus récemment formées (3e génération par exemple) ne sont pas radioactives alors que le reste du corps cellulaire montre une grande richesse en grains d'argent (Pl. III, fig. 17 et 18). Contrairement à la situation observée à la 60e minute, nous voyons maintenant qu'une boursouflure anciennement formée(par exemple de 2e génération) est radioactive, alors qu'une boursouflure nouellement formée ne l'est pas (Pl. III, fig. 17 et 19). On en conclut que les boursouflures de 3e ou de 4e ou de n^e génération, qui bourgeonnent sur un corps cellulaire fortement radioactif, sont cependant alimentées par du matériel macromoléculaire non radioactif, néosynthétisé au cours de l'expérience de chasse.

P L A N C H E I I I

Migration de la radioactivité dans les boursouflures cellulaires, après une incorporation de leucine-^{3}H (15 mn).

Figure 12 : Incorporation de la leucine-^{3}H au niveau du cytoplasme (ribosomes libres et associés, ergastoplasme granulaire, mitochondries et appareil de Golgi). Les boursouflures ne sont généralement pas marquées. (x 9600).

Figure 13 : Après 15 minutes de chasse, l'image autoradiographique tend à disparaître du pôle apical des cellules et se concentre dans les régions périnucléaires. d = desmosome ; (x 10 000).

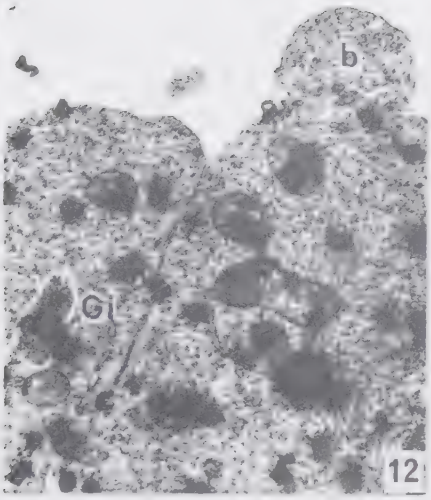
Figure 14 : Après 45 minutes de chasse, la radioactivité apparaît de nouveau au pôle distal des cellules. Les protéines marquées (néosynthétisées) commencent à alimenter les boursouflures (x 15 000).

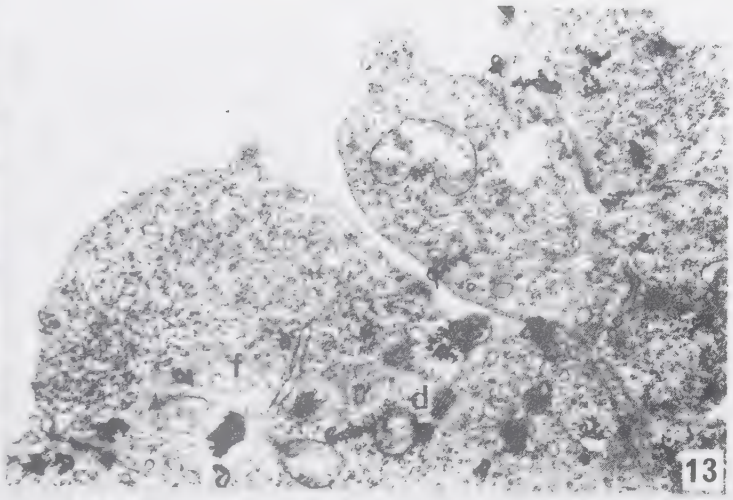
Figure 15 : 45 minutes de chasse ; le passage de l'onde de radioactivité permet de reconnaître plusieurs générations de boursouflures. Remarquer que les grains d'argent sont localisés dans une boursouflure en train de se former, (b2) ; par contre, une boursouflure plus ancienne (b1) n'est pas radioactive. On notera la présence de petites vésicules dans b1. (x 10 000).

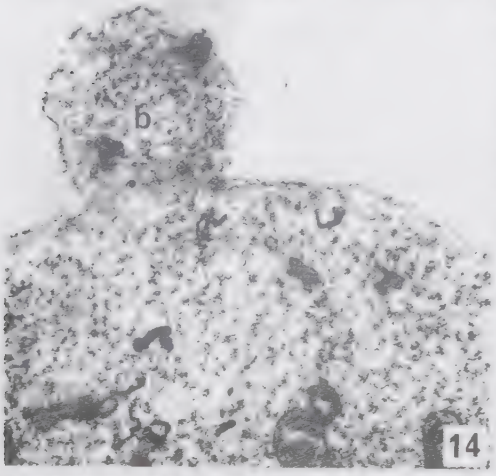
Figure 16 : 90 minutes après le début du pulse, les boursouflures montrent généralement une intense réaction autoradiographique. Nous appellerons arbitrairement "b2" ces boursouflures fortement radioactives, bien que plusieurs générations aient pu se succéder à ce temps de l'expérience. (x 10 000).

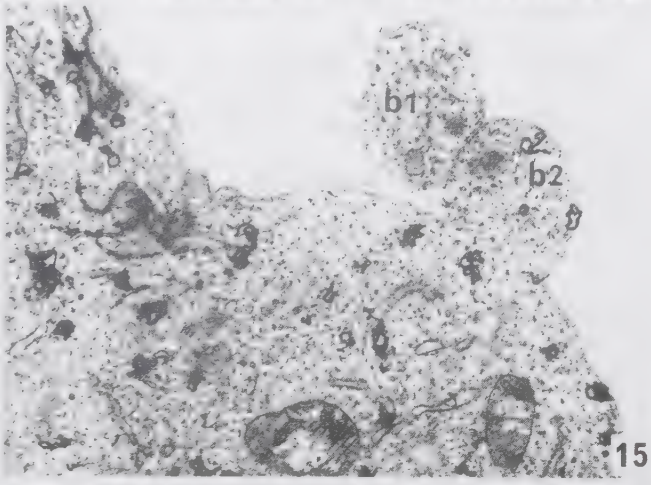
Figure 17 : 4 heures après le pulse ; une boursouflure éclate et libère son contenu radioactif dans le coelome. On remarque que les boursouflures nouvellement formées, de 3e génération par exemple (b3), ne sont pas radioactives. Une cellule épithéliale radioactive peut donc bourgeonner des boursouflures non-radioactives après un temps de chasse suffisant (x 10 000).

Figures 18 et 19 : Cinq heures après l'incorporation du traceur. Le marquage subsiste dans les noyaux, le cytoplasme, les mitochondries, les filaments et les membranes : ces grains correspondent vraisemblablement à du marquage stabilisé dans les structures. Par contre, on voit que les boursouflures formées par des cellules épithéliales radioactives ne montrent pas de réaction autoradiographique (b3), alors que les boursouflures des générations précédentes (b2) montrent un discret marquage (fig. 19). La situation est alors inverse de celle observée aux temps initiaux de l'expérience de chasse. Comparer les figures 19 et 15; mv = microvésicules alignées à la base des boursouflures (x 10 000).

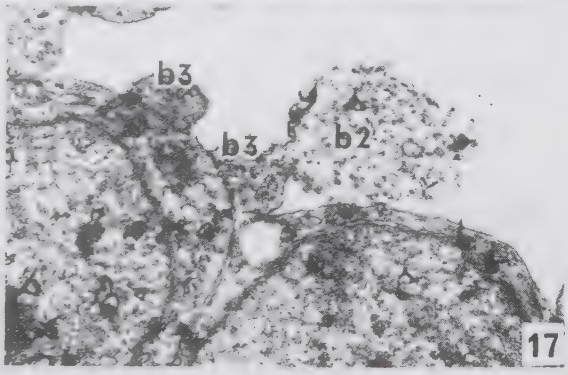

b
Gl
12

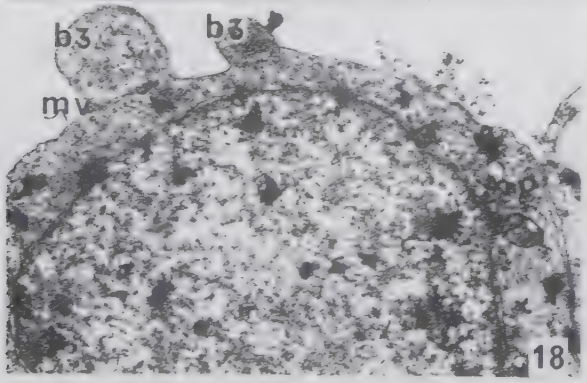

f
d
13

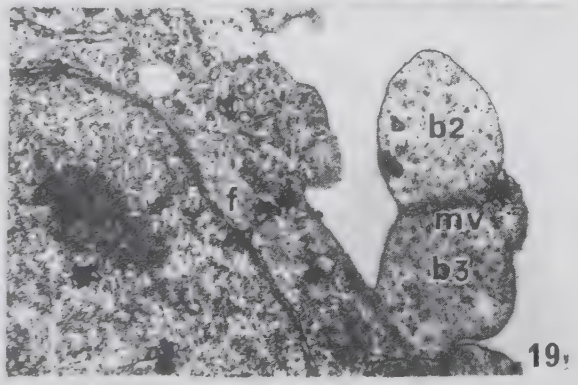

b
14


b1
b2
15

b2
16


b3
b3
b2
17


b3
b3
mv
18


b2
f
mv
b3
19

En résumé, ces expériences mettent en évidence le passage d'une onde de radioactivité dans les boursouflures cellulaires et permettent de démontrer l'existence de générations successives de boursouflures qui bourgeonnent et éclatent à la surface des cellules. En culture de blastodermes, un temps minimum d'environ 60 minutes est requis pour qu'une cellule radioactive bourgeonne des boursouflures radioactives. Ce délai correspond vraisemblablement à la durée de l'incorporation, puis de la synthèse, puis de la migration intracellulaire des protéines qui alimentent les boursouflures. De plus, après un temps suffisamment long, une cellule radioactive forme des boursouflures non radioactives. Ces faits suggèrent que les boursouflures ne sont pas de simples extrusions cellulaires et qu'il existe, dans les cellules épithéliales, au moins deux classes de protéines constituant deux pools différents et indépendants. L'un à renouvellement lent correspondrait aux protéines structurales. Le traceur introduit dans ce pool marque longtemps les structures cellulaires stables. L'autre pool, à renouvellement beaucoup plus rapide n'est pas directement décelable par l'observateur ; il représenterait les protéines excrétées, ou exportables.

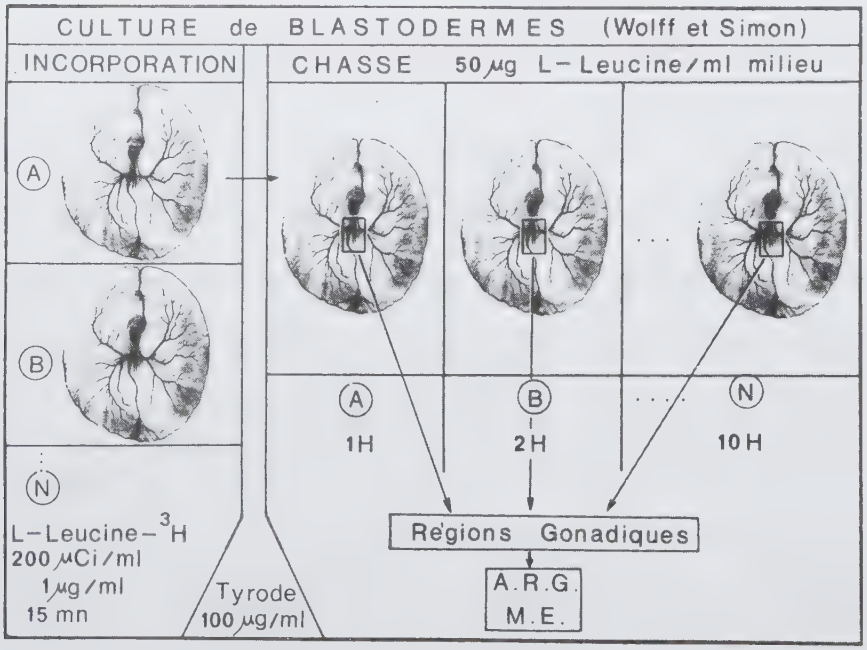
Ces conclusions reposent néanmoins sur une interprétation subjective de faits considérablement simplifiés : en réalité, le marquage et le démarquage des boursouflures ont un aspect statistique et n'apparaissent pas aussi tranchés que le laisserait croire le choix de nos illustrations. Il s'avère donc nécessaire de vérifier la validité de notre hypothèse sur l'existence d'un pool à turnover rapide par l'analyse cinétique des données quantitatives.

3.) Etude cinétique de la fonction excrétrice des épithéliums germinatifs : résultats préliminaires.

a-/ Expériences en culture de blastodermes (incorpo-

ration et chasse). Les expériences que nous venons de décrire ont fourni des données numériques que nous nous proposons d'analyser. Le protocole expérimental est rappelé dans le schéma ci-dessous. Ce schéma montre que les mesures commencent à partir de la 45e minute de chasse, l'unité de temps choisie étant l'heure. A chaque temps de fixation les blastodermes sont immergés dans du tyrode à 4°C. et les régions gonadiques sont prélevées.

S C H E M A I



Les résultats numériques sont consignés dans le Tableau I.

TABLEAU I

Activités des compartiments cytoplasmique et nucléaire (nombre de grains d'argent par 100 μ^2), après une incorporation de leucine-^3H (15 minutes).

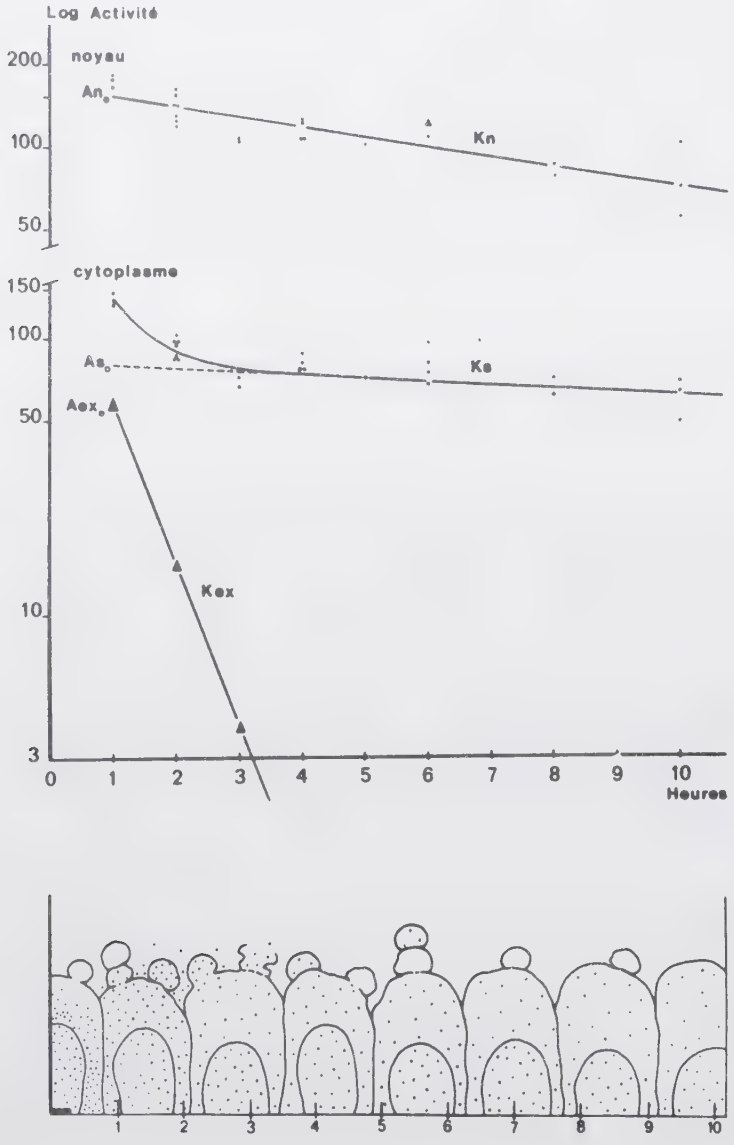
Chasse (heures)	Nbre d'exp.	Nbre de mesures	Activ. totales		Surfaces (μ^2)		Densité granulaire	
			Cyto.	Noyau	Cyto	Noyau	Cyto	Noyau
1	3	3	2950	1525	2140	865	138	176
2	4	7	6285	3555	6790	2685	92	133
3	2	2	1955	1240	2865	1170	69	106
4	4	4	2035	1445	2530	1240	80	117
5	1	1	625	460	875	450	71,5	102
6	3	4	2090	1800	2660	1540	79	117
8	2	2	1195	630	1805	765	66	83
10	2	3	1660	1275	2820	1710	59	75

Le tableau montre que pour certains embryons, il a été procédé à deux mesures dans deux séries autoradiographiques différentes. Seules les activités totales et les activités spécifiques moyennes ont été reportées dans ce tableau : le détail des mesures apparaît sur la représentation graphique I.

Les courbes de décroissance de la radioactivité en fonction du temps de chasse sont obtenues en portant en coordonnées semi-logarithmiques les valeurs des activités cytoplasmique et nucléaire et les temps correspondants (Graphique I).

G R A P H I Q U E I

Courbes exprimant la variation de la densité granulaire dans le cytoplasme et le noyau en fonction du temps (culture de blastodermes).



On voit que pour les protéines du noyau, les valeurs logarithmiques des activités mesurées s'inscrivent approximativement sur une droite. Nous pouvons en déduire que, dans ces conditions expérimentales et dans l'unité de temps choisie, un seul processus cinétique serait impliqué dans le renouvellement des protéines du compartiment nucléaire.

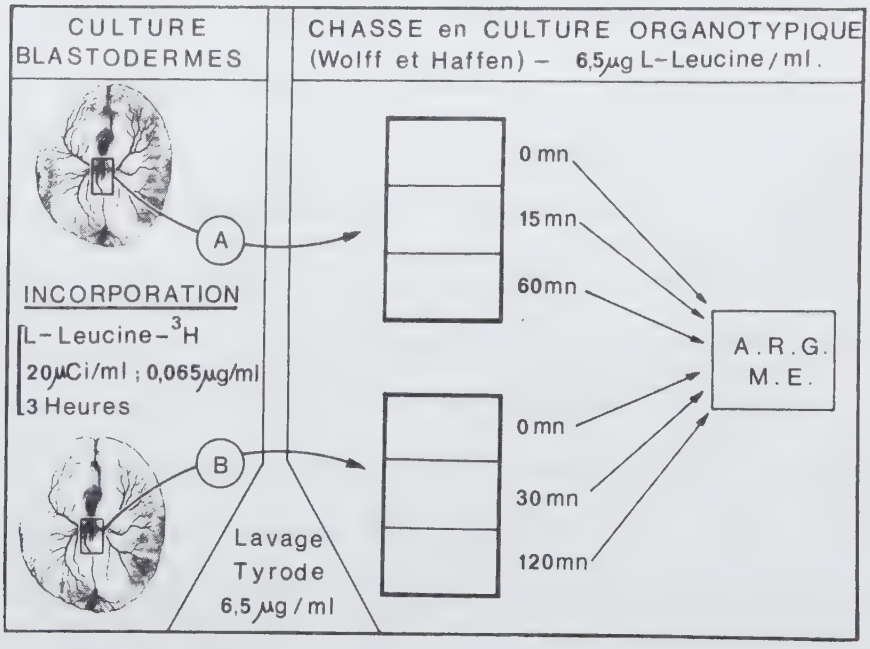
En ce qui concerne les protéines cytoplasmiques, les faits sont un peu plus complexes puisque les variations de la radioactivité en fonction du temps ne se traduisent pas par une droite. Nous remarquons cependant que les mesures aux temps les plus tardifs tombent sur une droite ;seules les deux premières mesures, aux temps initiaux, correspondent à une chute brutale de la courbe générale. Il est donc possible de reconnaître, dans la cinétique globale du renouvellement de la radioactivité cytoplasmique, la somme de deux processus : le processus cinétique le plus lent correspond à la partie rectiligne de la courbe expérimentale ; le processus cinétique le plus rapide est obtenu par différences de points entre les valeurs expérimentales initiales et les valeurs extrapolées du processus le plus lent. On vérifie en effet que les points calculés s'inscrivent sur une seconde droite (Kex) à forte pente.

Afin d'interpréter ces faits en termes de biologie, nous pouvons admettre que le pool cytoplasmique à renouvellement lent (Ks) caractérise les protéines sédentaires,structurales. Le second pool cytoplasmique représente des protéines à renouvellement rapide parmi lesquelles les protéines exportables élaborées par les cellules épithéliales et excrétées par le jeu des boursouflures et par diffusion à travers la membrane plasmique (sécrétion de type holo-mérocrine). Le fait qu'il existe une correspondance chronologique évidente entre la migration de l'onde de radioactivité dans les boursouflures et la cinétique de renouvellement rapide est un argument solide en faveur de cette interprétation (voir Graphique I). La lecture de ce même graphique permet également de voir que dans des conditions expérimentales identiques, les protéines nucléaires seraient soumises

à un processus de renouvellement unique. Ceci suggère que les voies de synthèse et de cheminement intracellulaire des protéines rapidement renouvelées sont essentiellement cytoplasmiques.

b-/ Expérience d'incorporation en culture de blastoderme et de chasse en culture organotypique.

S C H E M A II



L'expérience que nous venons de décrire montre que l'unité de temps choisie (1'heure) est trop grande pour la mesure correcte d'une cinétique dont la période biologique serait, en première approximation, de l'ordre de 30 minutes. D'autre part, il est vraisemblable que durant l'expérience de chasse sur milieu non radioactif, la région gonadique de chaque embryon demeure alimentée par la leucine-^{3}H libre de la circulation embryonnaire. Dans un tel système, l'intensité du processus cinétique le plus rapide pourrait être sous-estimée.

Ces considérations nous ont amené à procéder selon le protocole expérimental indiqué par le Schéma II ci-dessus.

L'expérience ainsi conduite a permis d'obtenir les données numériques qui font l'objet du Tableau II.

TABLEAU II

Activités des compartiments nucléaire et cytoplasmique après une longue incorporation de leucine-^{3}H (3 heures). Expérience de chasse en culture organotypique.

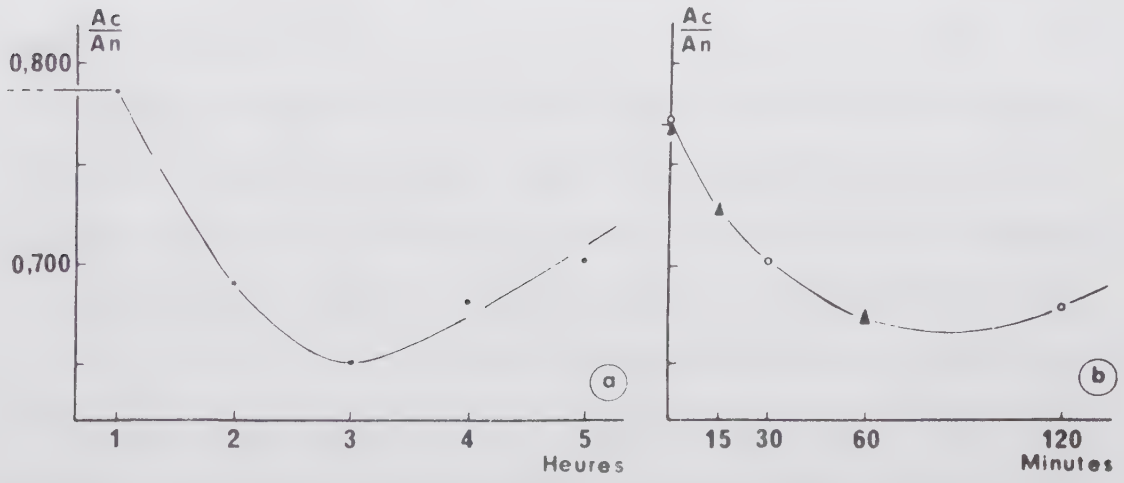
Temps après incorpor. (mn)	Activ. totales		Surfaces (μ^2)		Activ. spéc.		Valeurs (Ac/An)
	Cyto	Noyau	Cyto	Noyau	Cyto.(Ac)	Noyau (An)	
0 (Embryon A)	10567	5978	11700	5040	90,3	118,5	0,765
0 (Embryon B)	6922	4028	7830	3500	88,5	115	0,770
15 (A)	8824	5591	13750	6290	64,5	89	0,725
30 (B)	6373	3494	10400	4000	61	87	0,700
60 (A)	4237	2786	6420	2830	66	98,5	0,670
120 (B)	3865	1995	5500	1920	70	104	0,675

Pour de nombreuses raisons qui tiennent à la fois aux propriétés du matériel étudié et aux nouvelles conditions expérimentales, les résultats obtenus ne sont pas exploitables par une lecture directe : l'analyse graphique des variations de Ac et de An en fonction du temps, ne montrent pas de différence significative entre les cinétiques des renouvellements cytoplasmique et nucléaire. Il demeure toutefois possible d'extraire de précieux renseignements de ces données,pour décevantes qu'elles puissent paraître au premier abord. En comparant les embryons A et B, on constate que les valeurs des activités spécifiques du cytoplasme d'une part et du noyau d'autre part, sont pratiquement égales au temps initial. Ceci prouve que si l'expérimentateur s'impose un protocole expérimental rigoureux, les conditions d'incorporation en culture de blastoderme conduisent à des résultats d'une remarquable homogénéité. Cette remarque préalable est assez encourageante pour entreprendre un examen approfondi des données numériques en posant, comme hypothèse, l'existence d'un processus de renouvellement rapide propre au compartiment cytoplasmique. Nous avons porté, sur le graphique IIa, les variations du rapport activité du cytoplasme / activité du noyau en fonction du temps, dans l'expérience précédente, d'après les données du Tableau I. On voit que ce rapport prend la valeur initiale 0,785 ; il décroît et atteint un minimum (0,650) à 3 heures, puis croît de nouveau régulièrement ; à 10 heures, par exemple, sa valeur est 0,780. Il est clair que cette évolution du rapport Ac/An exprime qu'au début de l'expérience de chasse l'activité du cytoplasme chute beaucoup plus rapidement que celle du noyau, alors qu'aux temps plus tardifs, la situation s'inverse, mais à un moindre degré. Qu'en est-il dans le second type d'expérience ? En comparant

le graphique IIb au graphique IIa, nous constatons que les deux courbes ont la même allure générale. La seconde courbe, qui reproduit les valeurs calculées du Tableau II, est cependant plus intéressante et plus sûre car elle comporte plus de points sur une échelle de temps plus précise, dans sa partie descendante.

G R A P H I Q U E I I

Courbes représentant les variations de l'activité spécifique du cytoplasme (Ac) rapportées aux variations de l'activité spécifique du noyau (An), en fonction du temps : a/.Tableau I ; b/.Tableau II.



En nous appuyant sur l'expression graphique des seules données relatives du Tableau II, nous pourrions conclure que, au moins en première approximation, les deux courbes traduisent les mêmes processus fondamentaux, et que l'existence d'une décroissance rapide de l'activité cytoplasmique aux temps initiaux est confirmée, bien que les conditions expérimentales soient radicalement différentes. Mais il est possible d'atteindre une plus grande précision et il a été démontré (R. DUBOIS et D. CUMINGE, 29) que l'exploitation graphique et mathématique des courbes obtenues permet la mesure des taux de renouvellement. Nous ne produirons pas les développements de cette démonstration et nous nous limiterons aux conclusions qu'elle apporte :

- la mesure de l'intensité des processus de renouvellement lent conduit aux mêmes estimations dans l'une comme dans l'autre méthode expérimentale (5 à 8% par heure).

- ainsi qu'on pouvait s'y attendre, la chasse en culture organotypique permet de mettre en évidence un taux de renouvellement des protéines cytoplasmiques à turnover rapide plus important que celui trouvé dans l'expérience précédente : la valeur de ce taux (au moins 200 % par heure) a doublé, probablement du fait de la suppression de l'apport parasite en leucine-^{3}H libre.

- enfin, les calculs montrent qu'après une longue incorporation (3 heures), la radioactivité incorporée dans les protéines à turnover intense représente 14 % de l'activité totale du cytoplasme, alors qu'après une incorporation plus courte (15 minutes), cette proportion atteint 35 % de l'activité retrouvée dans le cytoplasme.

4.) Conclusion

Les protocoles expérimentaux que nous avons adoptés dans cette recherche préliminaire ne permettent de mesurer que les bilans grossiers d'une activité physiologique vraisemblablement fort complexe. C'est pourquoi ces premiers résultats nous ont paru moins intéressants pour leur valeur intrinsèque difficile à apprécier que pour les indications utiles qu'ils apportent en vue de l'élaboration de projets d'expériences.

L'étude de la région gonadique isolée en culture organotypique est préférable à celle de l'organe laissé en place en culture de blastoderme, pour une estimation des intensités des renouvellements. Les processus cinétiques mis en évidence semblent, d'une façon générale, relativement plus rapides que ceux mesurés dans divers systèmes adultes (M. BOUTEILLE, 7 ; B. DROZ, 19, 20 ; B. DROZ et C.P. LEBLOND, 22 ; L. FEENEY and S.L. WISSIG, 35 ; H. KOENIG et B. DROZ, 46 ; J.D. JAMIESON and G.E. PALADE, 43 ; H. WARSHAWSKY et all., 71 ; P. WHUR et all., 77 ; etc....). Ceci serait dû au fait qu'il s'agit d'un très jeune organe embryonnaire : nous devrons en tenir compte pour le choix de l'unité de temps dans les expériences futures. La différence qui apparaît, quelles que soient les conditions expérimentales, entre la cinétique de renouvellement des protéines nucléaires et celle des protéines cytoplasmiques implique qu'une catégorie de protéines cytoplasmiques sont éliminées par des processus métaboliques de grande intensité. L'activité excrétrice des cellules épithéliales, révélée par l'étude morphologique et dynamique des boursouflures qui éclatent à leur surface, suffirait à elle seule à rendre compte du profil de la courbe de renouvellement des protéines cytoplasmiques (graphique I). En ce sens, les descriptions morphologiques et cinétiques globales

s'accordent pour confirmer l'existence de protéines cytoplasmiques exportables. Mais il n'est nullement exclu que d'autres protéines d'origine cytoplasmique soient rapidement renouvelées par l'effet d'une diffusion à travers la membrane plasmique et par des mécanismes d'hydrolyse in situ.

D'après les données recueillies, il apparaît que l'unité de temps choisie pour nos mesures est beaucoup trop longue et nous pouvons soupçonner que de nombreux processus précoces ont échappé à nos investigations. D'autre part, le pool des protéines à renouvellement rapide est de dimensions relativement faibles : l'introduction du précurseur par un très court pulse devrait permettre d'avantager le marquage de ce pool à turnover intense au détriment de celui des protéines sédentaires et de favoriser ainsi l'étude des cinétiques les plus rapides. Enfin, le problème du site d'élaboration et des voies de migration intracellulaires, de même que celui de la nature biochimique et du rôle biologique des complexes protéiques exportables demeurent posés.

III. - SITES d'INCORPORATION et VOIES de MIGRATIONS INTRACELLULAIRES de la LEUCINE-^{3}H, en CULTURE ORGANOTYPIQUE.

Les résultats acquis par l'observation ultrastructurale et par l'étude globale des cinétiques de renouvellements démontrent que les épithéliums germinatifs attractifs ont une fonction excrétrice. Les expériences que nous venons de décrire restent cependant de portée limitée et ne donnent qu'un bilan grossier des phénomènes complexes qui se déroulent dans les cellules épithéliales. Notamment, elles n'apportent aucun renseignement précis sur les lieux de synthèse et les voies de migration intracellulaire des substances excrétées. Elles ne permettent pas de mettre en évidence d'éventuelles cinétiques précoces et des transferts d'activité entre différents compartiments cellulaires.

1.) Protocole expérimental. Les expériences sont faites sur les régions gonadiques isolées. Le précurseur radioactif est la L-Leucine-^{3}H-4-5 ; son A.S. est de 30 Ci/mmole (Section des Molécules marquées, SACLAY). Il est incorporé pendant 2 minutes en milieu liquide : la concentration est de 200 µCi/ml de tyrode ajusté à pH 7,5. La solution radioactive contient donc 0,87 µg de leucine par ml. Les régions gonadiques sont ensuite lavées dans du tyrode contenant de la L-Leucine non radioactive à la concentration de 87 µg/ml. L'expérience de chasse est faite en milieu liquide (tyrode enrichi en leucine "froide", 87 µg/ml) pour les temps courts. Pour les temps de chasse supérieurs à 5 minutes, les régions gonadiques sont cultivées sur un milieu de WOLFF et HAFFEN, enrichi en leucine froide (87 µg/ml de milieu). Pour les temps de chasse supérieurs à 15 minutes, les explants sont régulièrement lavés par le tyrode enrichi en leucine non radioactive.

2.) Etude morphologique dynamique.

a-/ Après 2 minutes d'incorporation (lavage très rapide dans le tyrode non radioactif et fixation). Pl. IV, fig. 20, la réaction autoradiographique marque tous les compartiments cellulaires, ainsi qu'il apparaît sur la représentation graphique des variations des densités en grains d'argent (Graphique III). Toutefois, la plupart des grains d'argent sont dispersés au niveau des ribosomes libres ou associés. L'ergastoplasme granulaire, assez pauvrement représenté dans ces cellules, est généralement faiblement marqué (Pl. II, fig. 9 et Pl. IV, fig. 20). Par contre, certains arrangements polyribosomiaux sont intensément marqués (Pl. II, fig. 11). A ce temps, les concentrations de la radioactivité dans le nucléoplasme et les complexes golgiens sont faibles (Graphique III). Enfin, il est intéressant de noter une importante

P L A N C H E I V

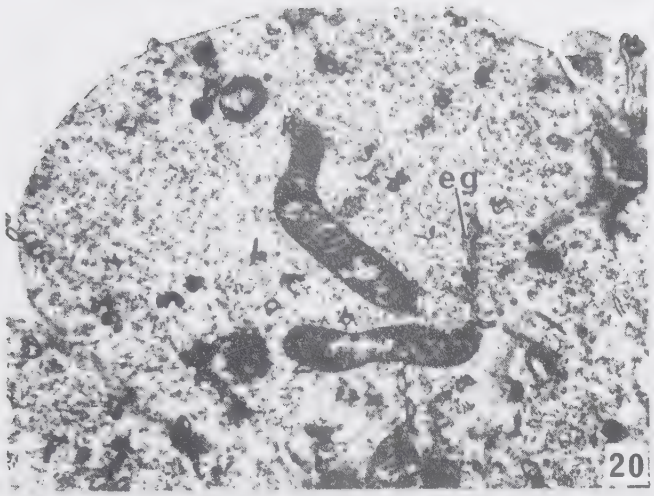
Sites d'incorporation et voies intracellulaires de migration de la radioactivité liée à la leucine tritiée.

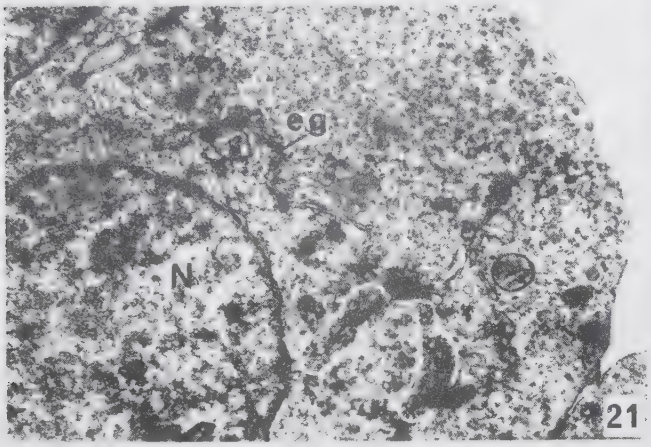
Figure 20 : Fixation immédiate après 2 minutes d'incorporation. Le marquage apparaît dans le cytoplasme au niveau des ribosomes libres et associés. L'ergastoplasme granulaire (eg.), pauvrement représenté, n'est pas radioactif. De nombreux grains d'argent sont localisés dans le cytoplasme apical et sur la membrane plasmique (x 11 500).

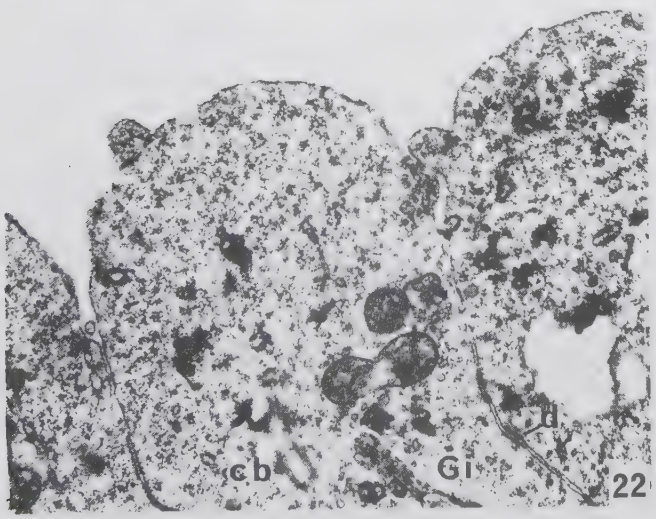
Figures 21 et 22 : Après une minute de chasse, net démarquage du cytoplasme apical et de la membrane plasmique. Les grains d'argent sont concentrés dans la région périnucléaire. L'ergastoplasme granulaire n'est pas - ou peu - marqué. Les appareils de Golgi ne sont pas radioactifs, mais de nombreux grains sont localisés dans leur proximité immédiate. Remarquer que les structures stables (membranes, barres terminales, desmosomes...) ne montrent pas de réaction autoradiographique (x 11 500 et 15 000).

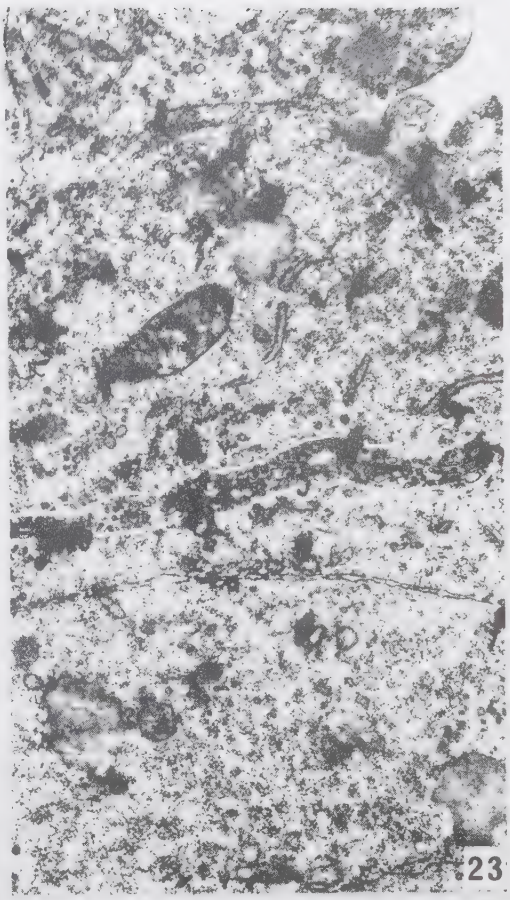
Figure 23 : Après 3 minutes de chasse, l'image autoradiographique apparaît sur les structures golgiennes. (x 15 000).

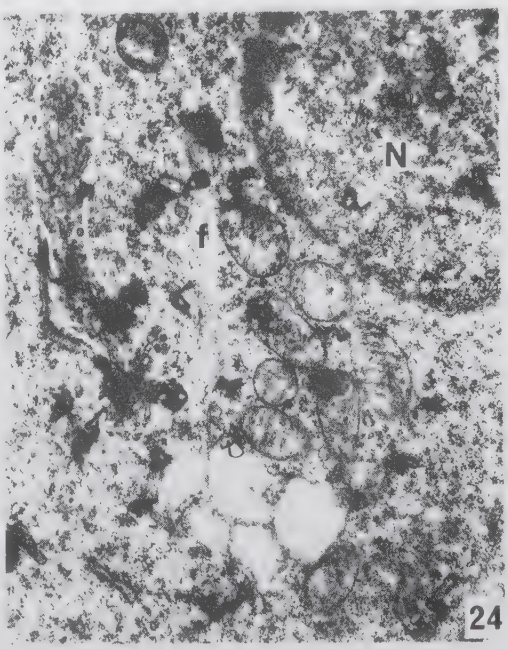
Figure 24 : Après 8 minutes de chasse, (10e minute de l'expérience) la réaction autoradiographique demeure intense sur les structures sacculaires des appareils de Golgi et dans le cytoplasme périgolgien. De nombreux grains d'argent sont retrouvés dans le compartiment nucléaire et sur les mitochondries, mais d'une façon générale, l'AS de l'espace cytoplasmique a fortement décru (cf. graphique III). (x 15 000).


eg
20


eg
N
21


cb
Gi
22


23


N
f
24

proportion de grains d'argent dans le cytoplasme périphérique et sur la membrane plasmique apicale.

b-/ Après 1 minute de chasse, on observe des changements importants dans la distribution du marquage. La disparition des grains d'argent qui étaient localisés dans le cytoplasme périphérique et sur les membranes plasmiques est particulièrement nette (Pl. IV, fig. 21 et 22). Par contre, on voit une plus forte concentration de grains dans la zone périnucléaire. L'activité spécifique de tous les compartiments cellulaires augmentant, il est probable que le démarquage des membranes et du cytoplasme apical traduit un déplacement des grains d'argent vers le centre de la cellule. D'une façon générale, la radioactivité n'apparaît pas dans les appareils de Golgi (Pl. IV, fig. 21 et 22), mais une réaction autoradiographique souvent intense marque la périphérie des dictyosomes et plus particulièrement les zones cytoplasmiques riches en chaînes polyribosomiales (Pl. IV, fig. 21 et Pl. II, fig. 11). Les éléments structuraux tels que les membranes, filaments, desmosomes et barres terminales ne sont pas radioactifs aux temps initiaux de l'expérience.

c-/ Après 3 minutes de chasse (5e mn de l'expérience) la réaction autoradiographique apparaît dans les complexes golgiens (Pl. IV, fig. 23). Certains dictyosomes sont fortement radioactifs, alors que d'autres ne montrent que peu de grains d'argent. Il n'est pas rare de voir des dictyosomes à activité nulle. Le marquage des appareils de Golgi est généralement accompagné d'un net démarquage des arrangements polyribosomiaux. Sur le plan strictement morphologique, (il en est autrement du point de vue cinétique) il n'y a pas de modification importante dans l'évolution du marquage au niveau des autres compartiments cellulaires,

P L A N C H E V

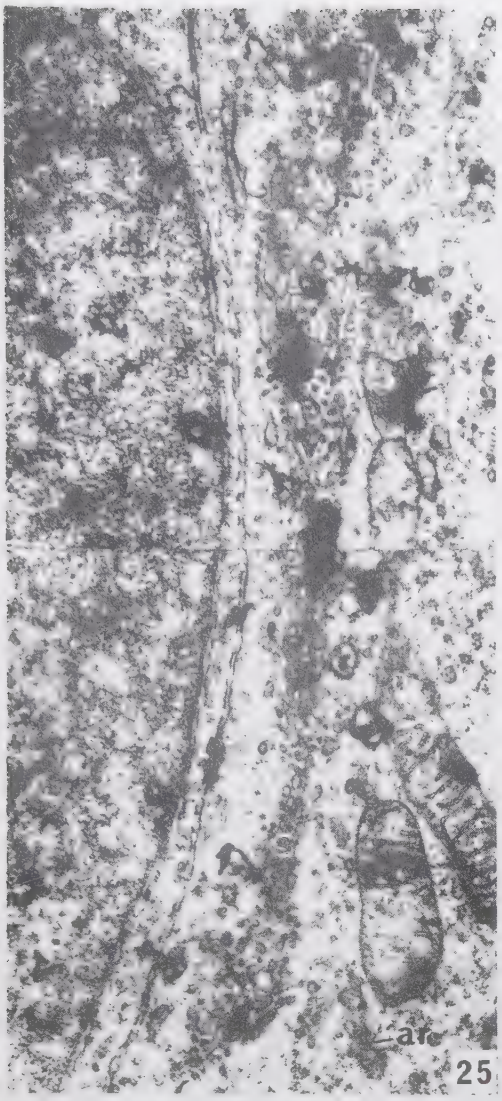
Sites d'incorporation et voies intracellulaires de migration de la radioactivité liée à la leucine tritiée (suite).

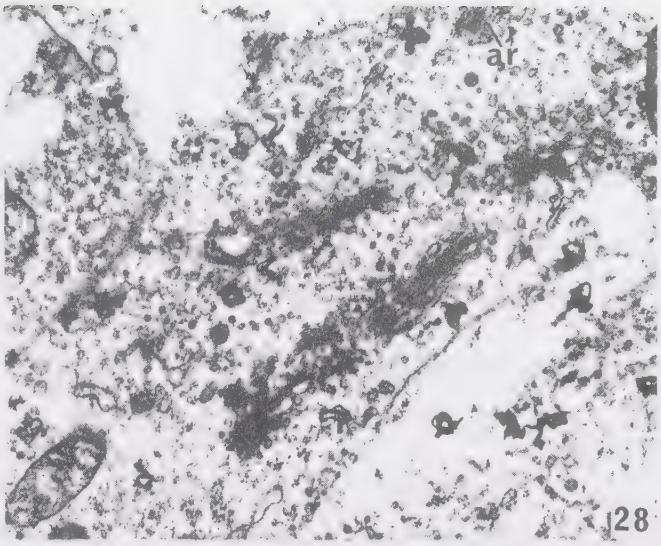
Figure 25 : 2 minutes d'incorporation suivies de 8 minutes de chasse. Evolution de la distribution des grains d'argent au niveau des sections de dictyosomes. Les grains disparaissent de la région sacculaire (s) et sont concentrés dans la zone vésiculaire (v). Noter que les arrangements ribosomiaux (ar), sites d'intense incorporation aux temps initiaux, sont totalement démarqués. (x 18 500).

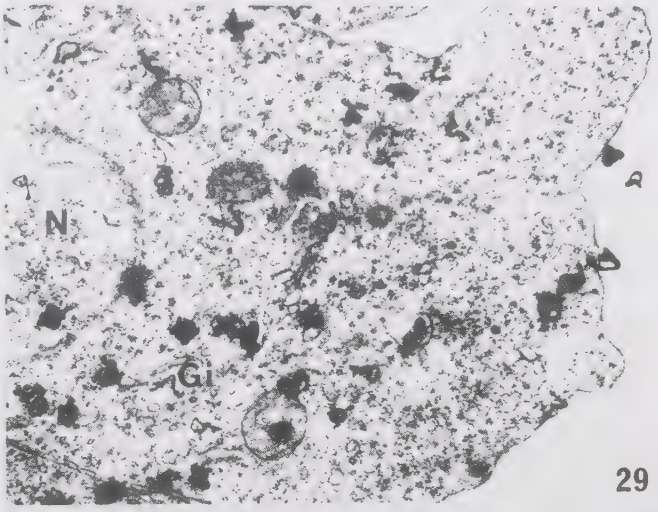
Figure 26 : Dans le même temps, la radioactivité réapparaît au pôle apical des cellules et sur la membrane plasmique, mais elle épargne généralement les boursouflures cellulaires. L'onde de radioactivité qui, à ce temps, envahit le cytoplasme périphérique n'est pas d'origine golgienne (voit texte). (x 12 000).

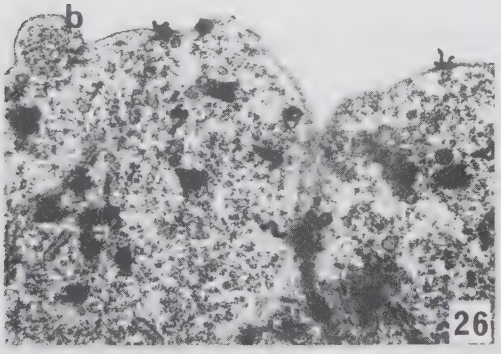
Figures 27, 28 et 29 : Après 13 minutes de chasse sur milieu enrichi en précurseur froid, la plupart des appareils de Golgi montrent une nette tendance à perdre leur radioactivité. Les grains sont préférentiellement retrouvés dans le voisinage immédiat des structures golgiennes : le démarquage des dictyosomes se fait vraisemblablement par expulsions brusques des produits intragolgiens. La réaction autoradiographique subsiste dans le cytoplasme apical de certaines cellules (fig. 29). (x 12 000 ; 14 000 et 12 000).

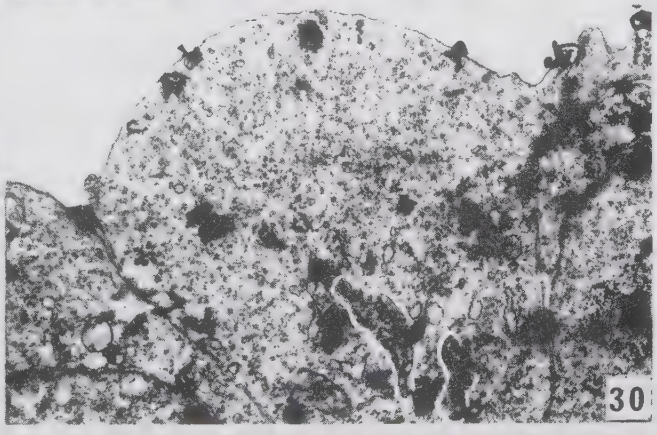
Figures 30 et 31 : A la 30e minute de l'expérience; la réaction autoradiographique a sensiblement décru dans certaines plages cytoplasmiques périphériques tandis que de nombreux grains soulignent la membrane plasmique (fig. 30). Dans le même temps, le démarquage du compartiment golgien s'accompagne de l'apparition de macromolécules radioactives dans les boursouflures cellulaires (fig. 31) (x 12 000).

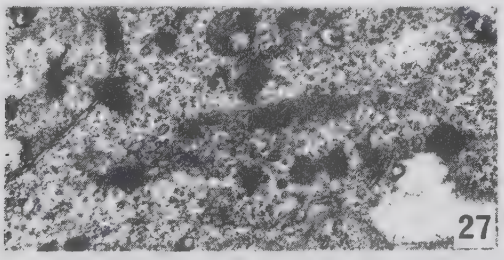

ar
25

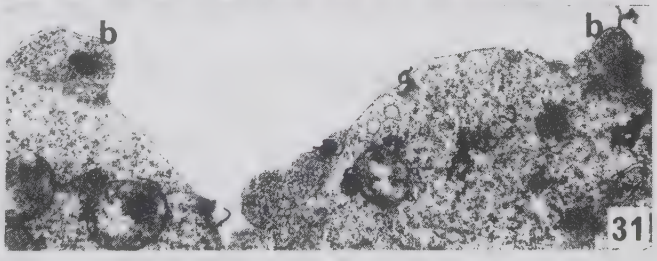

ar
28


N
Gl
29


b
26


30


27


b
b
31

et cette situation demeure inchangée durant les 10 premières minutes de l'expérience.

d-/ A partir de la 10e minute de l'expérience, les évènements qui se produisent dans la population golgienne sont très diversifiés et doivent faire l'objet d'une description nuancée. Certains dictyosomes sont fortement marqués, de nombreux grains d'argent couvrant les structures sacculaires (Pl. IV, fig. 24) ; pour d'autres, l'image autoradiographique est localisée dans la zone vésiculaire du complexe golgien, alors que la région des saccules n'est pas radioactive (Pl. V, fig. 25) ; d'autres enfin ont une activité spécifique très faible ou nulle. On assiste à la réapparition du marquage dans le cytoplasme périphérique : les zones apicales et les membranes plasmiques montrent de nombreux grains d'argent. Toutefois, les boursouflures cellulaires ne sont pas radioactives à ce temps (Pl. V, fig. 26). L'analyse des courbes de renouvellement (Graphique III) montre que la radioactivité commence à décroître dans l'ensemble des appareils de Golgi. Mais pour des raisons d'ordre quantitatif, cette activité rapidement renouvelée dans les dictyosomes ne peut rendre compte de l'intense réaction autoradiographique du cytoplasme périphérique : cette dernière traduit plus vraisemblablement un brassage de complexes protéiniques qui transitent rapidement par des voies essentiellement cytoplasmiques. Leur élimination par hydrolyse in situ et par diffusion à travers la membrane plasmique correspondrait à une importante fraction de la radioactivité cytoplasmique soumise à un turnover rapide aux temps initiaux.

e-/ A partir de la 15e minute de l'expérience, il est encore possible de voir quelques dictyosomes fortement radioactifs, mais la tendance générale est à la disparition du marquage

dans les appareils de Golgi. La plupart des dictyosomes ont une activité spécifique faible ou nulle. On voit fréquemment une concentration de grains d'argent dans la proximité immédiate des dictyosomes non radioactifs (Pl. V, fig. 27, 28 et 29). De telles images suggèrent que le démarquage des appareils de Golgi se fait par une expulsion brusque de leur contenu radioactif et non par un renouvellement continu et régulier. A ce même temps de l'expérience, on note une diminution globale de l'intensité du marquage cytoplasmique (graphique III), mais la région apicale et la membrane plasmique de certaines cellules demeurent marquées (Pl. V, fig. 29).

f-/ A partir de la 30e minute de l'expérience, de nombreux grains révèlent des complexes protéiniques au niveau de la membrane plasmique apicale (Pl. V, fig. 30) et la radioactivité apparaît nettement dans les boursouflures cellulaires (Pl. V, fig. 31). Dans le même temps, au cours de l'expérience de chasse, les appareils de Golgi fortement radioactifs deviennent de plus en plus rares. Toutefois, quelques sections de dictyosomes sont encore entourées d'une forte concentration de grains (Fig. 30). En ce qui concerne l'évolution de la radioactivité dans les autres compartiments cellulaires, les changements d'ordre morphologique sont très discrets. Il semble cependant que la densité granulaire s'affaiblit sensiblement dans certaines plages cytoplasmiques périphériques (fig. 30). L'exploitation des données quantitatives devrait permettre de préciser ces points.

g-/ En résumé, la description morphologique des processus qui se produisent à la suite d'une très courte incorporation de leucine-^{3}H permet de faire ressortir les faits suivants :

- les différents compartiments cellulaires se marquent précocement, à l'exception des structures stables.

- la distribution des grains d'argent révélant les protéines néosynthétisées change au cours de l'expérience de chasse, suggérant l'existence de transferts intracellulaires très précoces. On remarque notamment que le signal radioactif n'apparaît nettement dans le compartiment golgien qu'à la 5e minute de l'expérience et que les boursouflures cellulaires ne sont radioactives qu'après le démarquage des dictyosomes (30e minute de l'expérience).

- ces faits semblent traduire l'existence d'une voie métabolique dans laquelle les dictyosomes joueraient un rôle dans l'élaboration de protéines particulières. Il reste cependant qu'une très importante fraction de macromolécules néosynthétisées ont une vie intracellulaire strictement cytoplasmique et sont soumises à un turnover intense par hydrolyse in situ ou/et par diffusion à travers la membrane plasmique (fonction excrétrice holo-mérocrine).

- il est clair cependant que les critères morphologiques ne peuvent apporter, à eux seuls, les preuves de transferts d'activité. Ils doivent être étayés par des données quantitatives qui permettent de vérifier si les conditions de transferts d'activité sont, - ou non -, satisfaites. Il est donc nécessaire d'entreprendre l'étude cinétique des variations de l'activité spécifique dans les différents compartiments cellulaires, en fonction du temps.

3.) Analyse cinétique globale.

a-/ Résultats numériques bruts. Les activités totales en nombre de grains d'argent, les surfaces totales des compartiments cellulaires étudiés, les activités spécifiques (densités granulaires par 100 μ^2) et les temps correspondants sont

consignés dans le Tableau III. Dans ce tableau, nous avons indiqué les valeurs de l'intervalle de confiance des moyennes ($T.s_m$), calculées pour un coefficient de sécurité de 99%.

TABLEAU III

Activités incorporées dans différents compartiments cellulaires après une courte incorporation (2 mn) de leucine-^3H, en fonction du temps de chasse. (AS = densité granulaire/100 μ^2).

TEMPS		2 mn	3 mn	5 mn	10 mn	15 mn	30 mn	60 mn
Noyau	Surface	1185	344	774	690	2126	2314	1840
	Activité	312	163	420	335	1015	910	548
	AS $\pm$ $T.s_m$	$26\pm3,6$	$47,5\pm5,2$	$54\pm4,6$	$48,5\pm5,5$	48 ± 8	$39\pm5,4$	$30\pm4,3$
Nucléole	Surface	75	31	66	73	234	176	160
	Activité	45	21	80	95	251	141	130
	AS	60	68	120	130	107	80	81
Cytoplasme	Surface	4100	905	2060	2360	5690	4750	4590
	Activité	2470	795	1254	994	2179	1495	1106
	AS $\pm$ $T.s_m$	$60\pm5,5$	$88\pm6,7$	61 ± 5	42 ± 4	$38,4\pm3,3$	$31,5\pm3,9$	$24\pm2,1$
Mitochon.	Surface	168	43	95	100	218	199	198
	Activité	176	67	130	136	249	152	131
	AS	105	156	137	136	114	76	66
Golgis	Surface	50	20	54	40,5	193	120	117
	Activité	22	14	68	69	231	102	81
	AS	44	70	154	170	120	85	69
Surface totale		5578	1343	3039	3263	8461	7559	6905
Activité totale		3025	1060	1952	1629	3925	2800	1996
AS / 100 μ^2 de cellule		54	79	64	50	46,5	37	29

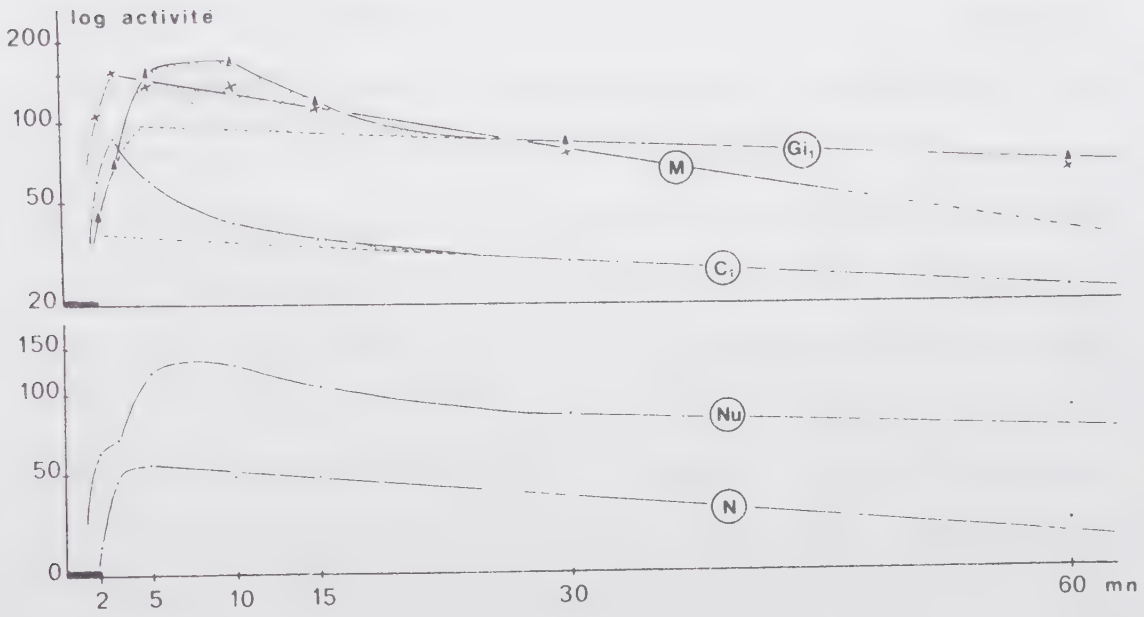
Les variations des activités spécifiques représentées dans le tableau III sont exprimées par les courbes du Graphique III.

b-/ Analyse des courbes de variation des densités granulaires spécifiques à chaque compartiment.

Cytoplasme : L'activité croît durant les 3 premières minutes de l'expérience, puis décroît brusquement entre la 3e et la 15e minute. Après une vingtaine de minutes de chasse, le logarithme de l'activité cytoplasmique décroît linéairement en fonction du temps, avec un taux de renouvellement inférieur à 1%.mn^{-1} (partie C_1 de la courbe).

G R A P H I Q U E I I I

Variations, en coordonnées semi-logarithmiques, de l'activité spécifique du nucléoplasme (N), des nucléoles (Nu), des mitochondries (M), des appareils de Golgi (Gi) et du cytoplasme (C), en fonction du temps de chasse après une courte incorporation de leucine -^{3}H (2mn).



Mitochondries : La concentration de la radioactivité augmente jusqu'à la 3e minute. Puis l'activité est renouvelée selon un processus cinétique simple, au moins durant les 30 premières minutes. Le marquage est distribué au hasard dans l'ensemble de la population mitochondriale (loi de Poisson) : dans l'unité de temps choisie, cette population apparaît donc homogène et le renouvellement des protéines s'y effectue de façon continue.

Appareils de Golgi : Le profil de la courbe de variation de la concentration de la radioactivité dans l'ensemble des appareils de Golgi est plus complexe, sauf dans sa partie terminale rectiligne où l'activité est renouvelée selon une loi de décroissance exponentielle simple du temps (taux = 0,65 %.mn^{-1}). L'extrapolation,

à l'origine, de la droite permet de reconnaître deux phases dans les processus d'incorporation : une entrée relativement régulière et lente du précurseur durant les 3 premières minutes, suivie d'un brusque accroissement de l'AS entre la 3e et la 5e minute de chasse. A cette augmentation brutale de l'activité mesurée dans l'ensemble de la population golgienne, correspond l'apparition des sections de dictyosomes fortement radioactives (Pl. IV, fig. 23 et 24). Concomitamment, les AS du cytoplasme et des mitochondries diminuent. Cette situation persiste jusqu'à la 10e minute, puis l'AS moyenne de la population golgienne décroît rapidement. Sur le plan morphologique, les dictyosomes à forte AS ont pratiquement disparu après 28 minutes de chasse. (Pl. V, fig. 30).Aux temps initiaux, la distribution du marquage dans l'ensemble de la population golgienne n'est pas due au hasard : les deux processus cinétiques ne coexisteraient pas dans tous les dictyosomes ; certains appareils de Golgi seraient "lents" alors que d'autres seraient "rapides". Nucléoplasme et nucléoles : L'AS du nucléoplasme croît jusqu'à la 5e minute. Elle est ensuite renouvelée selon un processus cinétique dont le taux de renouvellement est voisin de $1\%.mn^{-1}$, au moins durant les 30 premières minutes de l'expérience. En ce qui concerne les nucléoles, les variations du logarithme de l'AS en fonction du temps, présente des ressemblances évidentes avec les phénomènes observés au niveau des appareils de Golgi.

4.) Analyse des processus cinétiques précoces dans le cytoplasme et l'ensemble des appareils de Golgi. Après extrapolation à l'origine des cinétiques les plus lentes (C_1 et Gi_1, Graphique III), il est possible d'analyser dans les mêmes coordonnées, les cinétiques précoces figurées par les zones pointillées du graphique III.

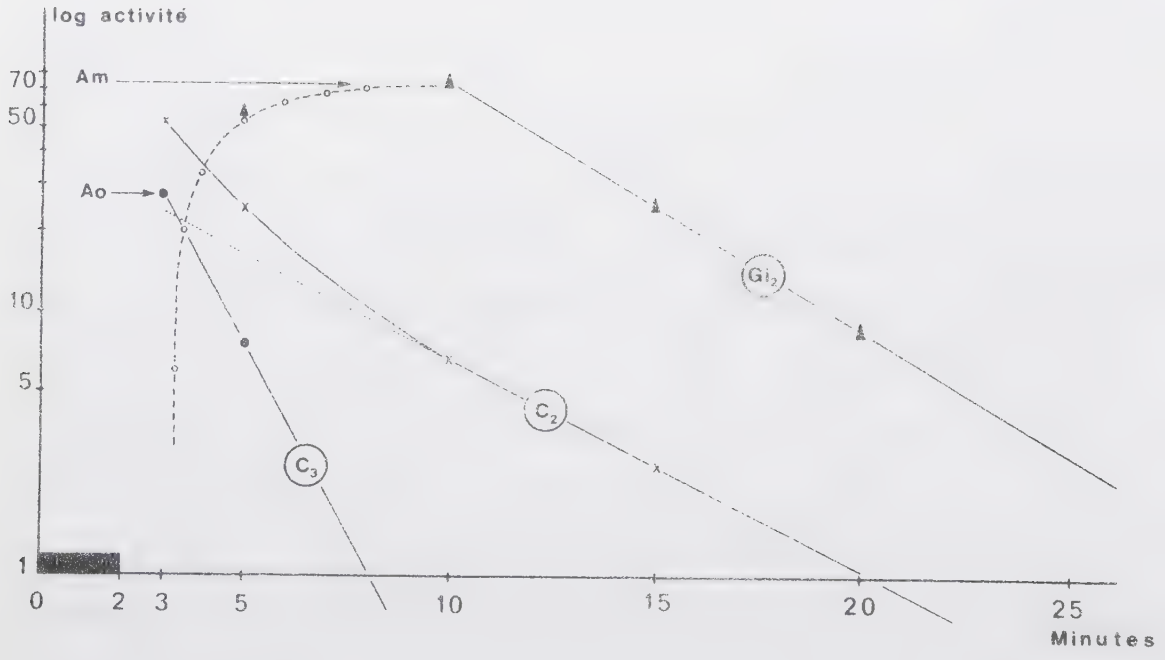
a-/ Conditions cinétiques d'un transfert d'activité entre le cytoplasme et les appareils de Golgi. L'interprétation graphique des données permet de montrer que la décroissance de l'AS du compartiment cytoplasmique peut être décomposée en deux processus cinétiques distincts représentés par les droites C_2 et C_3 du graphique IV (taux respectifs : 18 %.mn^{-1} et 66 %.mn^{-1}). La droite C_3 traduit le turnover d'un pool cytoplasmique d'un intérêt particulier. Il existe en effet une correspondance cinétique et chronologique entre la disparition de la radioactivité introduite dans ce pool et l'apparition de la radioactivité qui marque rapidement et intensément la population golgienne entre les 3e et 10e minutes de l'expérience : courbe en traits interrompus du graphique IV. Il est possible de calculer qu'à la 5e minute de l'expérience, le pool cytoplasmique C_3 s'est appauvri de 72 % de son activité initiale A_o alors que le pool golgien s'est enrichi de 75 % de son activité finale A_m. Les conditions d'un transfert de protéines cytoplasmiques néosynthétisées sont donc satisfaites puisque le taux de disparition de la radioactivité dans C_3 mesure l'intensité de l'approvisionnement des appareils de Golgi en produits marqués (66 %.mn^{-1}).

b-/ Conditions quantitatives d'un transfert de radioactivité. Des renseignements d'ordre quantitatif peuvent apporter une preuve supplémentaire en faveur de l'existence d'un transfert d'activité de (C_3) vers l'ensemble des dictyosomes.

Afin de traduire les éventuels échanges entre divers compartiments cellulaires en termes quantitatifs, nous utiliserons les variations des AS lues graphiquement pour les divers compartiments, et les dimensions relatives de ces compartiments. Les nombres de grains d'argent perdus (-) ou gagnés (+) par les différents compartiments cellulaires d'une cellule de 100 μ^2 (unité arbitraire) sont consignés dans le Tableau IV, p.47).

G R A P H I Q U E I V

Analyse, en coordonnées semi-logarithmiques, des cinétiques précoces dans le cytoplasme et l'ensemble des appareils de Golgi (zones pointillées du graphique III).



Explication du graphique IV : La droite C_3 représente les variations de la radioactivité non renouvelée dans le pool cytoplasme dont le turnover est le plus intense. La courbe en trait interrompu et en cercles clairs représente les variations de l'activité renouvelée dans ce même pool. Les triangles pleins représentent les variations de la radioactivité rapidement incorporée puis renouvelée dans l'ensemble de la population golgienne.

Le calcul des nombres de grains qui sortent (-) des différents pools entre la 3e et la 5e minute de l'expérience permet d'établir que les activités renouvelées dans le pool C_1, dans le

nucléoplasme et dans les mitochondries ne peuvent quantitativement rendre compte de l'approvisionnement des appareils de Golgi. Par contre, il sort du pool, C_2 ou du pool C_3 un nombre suffisant de grains pour alimenter à la fois, et dans le même temps, l'ensemble des complexes golgiens d'une part, et celui des nucléoles d'autre part. Mais on remarque de surcroît qu'à la 10e minute de chasse le pool C_3 a renouvelé la quasi-totalité de son activité initiale. Ce n'est pas le cas du pool C_2 qui renferme encore environ 40 % de son activité initiale. Si à partir de la 10e minute on n'enregistre plus d'incorporation dans les dictyosomes, on peut penser que c'est du fait de l'épuisement de l'activité introduite dans le pool responsable de l'approvisionnement du compartiment golgien, ce qui élimine C_2 comme étant ce pool. L'ensemble de ces faits montre qu'une proportion, d'ailleurs faible, des protéines cytoplasmiques du pool C_3 (le plus rapidement renouvelé) migrent dans les appareils de Golgi.

TABLEAU IV

Bilan de sortie (-) et d'entrée (+) de la radioactivité, exprimée en nombre de grains d'argent, dans différents compartiments cellulaires, entre les 3e et 5e minutes de l'expérience.

Pools	AS (Nb de gr./100 μ^2) 3 mn	5 mn	Variations de la densité en grains / 100 μ^2	Surfaces relatives	Activités transférées
N	55 (?)	54	- 1 gr./100 μ^2	25,4	- 0,25
C_1	37	36	- 1 gr./100 μ^2	68	- 0,68
C_2	24	16,5	- 7,5 gr./100 μ^2	68	- 5
C_3	27	7,5	- 19,5 gr./100 μ^2	68	- 13
M	155	145	- 10 gr./100 μ^2	2,8	- 0,28
Nu	0	50	+ 50 gr./100 μ^2	2,2	+ 1,1
Gi	0	55	+ 55 gr./100 μ^2	1,6	+ 0,9

c-/ Renouvellement de la radioactivité dans l'ensemble des appareils de Golgi. L'interprétation de la représentation graphique montre que les protéines intragolgiennes séjournent quelque temps (environ 7 minutes) dans le compartiment golgien. A partir de la 10e minute, l'AS du "pool golgien" décroît rapidement, avec un taux de renouvellement de 20 %.mn^{-1}(Gi_2). Lorsque la radioactivité liée à ces complexes protéiques est éliminée, seule subsiste la cinétique la plus lente, Gi_1.

L'analyse des résultats obtenus après une longue incorporation de leucine-^{3}H (3 heures en culture de blastodermes, voir page 28) conduit à la même estimation de la valeur de l'intensité du renouvellement des protéines intragolgiennes (20 %.mn^{-1}).

IV. - LA FONCTION EXCRETRICE des EPITHELIUMS GERMINATIFS : DISCUSSION et CONCLUSION.

L'observation des épithéliums germinatifs à l'échelle ultrastructurale permet de constater qu'ils constituent une cible facile à une invasion cellulaire. L'aspect dissocié de ces épithéliums et la présence de boursouflures qui éclatent à la surface des cellules suggèrent l'existence d'une fonction excrétrice.

En raison de certaines difficultés, l'étude sélective de ces organes embryonnaires échappe aux méthodes classiques de l'analyse biochimique. L'étude de cette hypothétique fonction excrétrice a cependant pu être abordée par la mise en oeuvre de précurseurs radioactifs, combinée à l'autoradiographie de haute résolution.

Les données morphologiques dynamiques et cinétiques s'accordent sur les points suivants :

1.) En utilisant la leucine-^{3}H dans des conditions expérimentales déterminées, il est possible de mettre en évidence le passa-

ge d'une onde de radioactivité (protéines néosynthétisées) dans les boursouflures cellulaires. Une importante fraction de complexes protéiques cytoplasmiques néosynthétisés est soumise à un turnover rapide par le jeu de boursouflures éclatant à la surface des cellules épithéliales et par diffusion à travers la membrane plasmique (sécrétion de type holo-mérocrine).

2.) En injectant un court signal radioactif (2 mn) dans le système étudié, des précisions d'ordre topochimique ont été obtenues :

- la réaction autoradiographique apparaît aux temps initiaux dans les divers compartiments cellulaires, traduisant soit des synthèses protéiques, soit des transferts très précoces.

- le renouvellement des macromolécules protéiniques néosynthétisées semble continu et régulier dans les mitochondries et les noyaux.

- dans les nucléoles, les appareils de Golgi et le cytoplasme (ergastoplasme granulaire et systèmes ribosomiaux), les modalités du renouvellement sont plus complexes. Compte tenu des conditions expérimentales, il est clair qu'une importante fraction des protéines cytoplasmiques sont soumises à un turnover intense et ne correspondent pas à des protéines structurales stables.

3.) L'analyse cinétique des processus de renouvellement dans l'espace cytoplasmique permet de montrer qu'il existe un transfert de macromolécules radioactives vers le compartiment golgien. Certains dictyosomes élaborent des produits de transformation à partir de précurseurs polypeptidiques d'origine cytoplasmique ; ils sont alimentés par un "pool cytoplasmique" à turnover très intense ($66\ \%.mn^{-1}$). Les produits de transformation intra-golgiens sont eux-mêmes renouvelés, après un séjour intra-golgien d'une durée de 7

minutes, au taux de 20 %.mn^{-1}. L'analyse statistique de la distribution du marquage sur les sections de dictyosomes montre que la population golgienne n'est pas fonctionnellement homogène dans son activité métabolique : tous les dictyosomes ne travaillent pas au même moment, avec la même intensité pour les mêmes processus biochimiques. La maturation des produits de transformation intragolgiens à renouvellement intense est asservie à l'activité physiologique rythmique et asynchrone d'une fraction de la population golgienne, elle-même soumise à un incessant remaniement (R. DUBOIS, 26).

4.) Les faibles dimensions de ce "pool golgien" à turnover rapide (à peine 2 % des protéines néoformées dans les conditions expérimentales adoptées) ne permettent pas de suivre, morphologiquement ou cinétiquement, la destinée des substances élaborées dans les appareils de Golgi après leur expulsion dans le cytoplasme. Il n'a donc pas été possible de vérifier, par l'emploi d'un acide aminé essentiel, s'il existe une filiation entre les complexes protéiques golgiens et les protéines exportables excrétées par les épithéliums germinatifs attractifs. Cependant cette hypothèse demeure plausible et on remarque, d'une façon générale, que le démarquage des appareils de Golgi précède l'apparition de l'image autoradiographique dans les boursouflures cellulaires. Il reste néanmoins que cette voie particulière de tansit intracellulaire n'est empruntée que par une proportion très faible des protéines néosynthétisées et que la plus grande partie des macromolécules sont soumises à un renouvellement rapide (excrétion mérocrine et/ou hydrolyse in situ), sans étape intragolgienne.

5.) En résumé, la technique autoradiographique nous apporte des renseignements intéressants en nous révélant l'exis-

tence de protéines exportables d'une part et le rôle des appareils de Golgi dans l'élaboration de substances particulières d'autre part. Or il est bien connu que dans plusieurs systèmes, les appareils de Golgi représentent des sites d'intense glycosylation des protéines (P. FAVARD, 34) et que de nombreuses substances exportables sont précisément des complexes glycoprotéiques (E.H. EYLAR, 33).

DEUXIEME PARTIE

BIOSYNTHESE GLYCOPROTEIQUE dans les CELLULES EPITHELIALES des EBAUCHES GONADIQUES

I.- INCORPORATION de GALACTOSE TRITIE, en CULTURE ORGANOTYPIQUE et ROLE des APPAREILS de GOLGI.

Il ressort de nombreux travaux d'ordre autoradiographique (B. DROZ, 21 ; G. FORTEZA BOVER et all., 36 ; K. NAKAGAMI et all., 55 ; M. NEUTRA et C.P. LEBLOND, 56, 57 ; A. RAMBOURG et B. DROZ, 63 ; R. ROBINEAUX et all., 67 ; A. WEINSTOCK et C.P. LEBLOND, 72 ; P. WHUR et all., 77 ; D. ZAGURY et all., 81) que dans les cellules élaborant des glycoprotéines exportables, c'est préférentiellement au niveau des dictyosomes que le galactose est incorporé dans les macromolécules en voie de synthèse. Nous avons donc étudié les sites intracellulaires d'incorporation et les voies de migration du galactose-^{3}H dans notre matériel.

1.) Protocoles expérimentaux. Notre étude a été poursuivie par la mise en oeuvre de plusieurs types d'expériences réalisées in vitro sur les régions gonadiques isolées. Dans toutes les séries expérimentales, le précurseur utilisé est le D-Galactose-1-^{3}H, AS : 6,9 Ci/mmole, New England Nuclear. Ces diverses techniques expérimentales sont sensiblement différentes sur le plan méthodologique, répondant en cela aux exigences de l'étude des processus cinétiques. Sur le plan qualitatif, les résultats obtenus dans les diverses séries sont en excellent accord.

a-/ Une série expérimentale préliminaire (500µCi/ml de milieu) a porté sur un faible échantillonnage et n'a pas été exploitée du point de vue quantitatif. Elle a permis d'établir que la

radioactivité liée au précurseur conjugué aux macromolécules apparaît d'emblée dans les espaces nucléaire et cytoplasmique. L'incorporation dans le compartiment golgien est légèrement différée : elle ne se produirait qu'à la fin de la 5e minute. Particulièrement nette au cours de la 6e minute, l'image autoradiographique persiste à la 10e minute. Le démarquage des sections de dictyosomes serait amorcé à la 15e minute de l'expérience. Ces premières observations ont servi de base à l'élaboration de protocoles expérimentaux que nous résumons brièvement. Les détails pratiques qui se rapportent à l'exécution de chaque type d'expérience sont les mêmes que ceux indiqués à propos de la leucine tritiée (cf. page 35).

b-/ Conditions d'incorporation et de chasse dans divers types d'expériences exploitables du point de vue qualitatif et quantitatif.

Séries exples	temps d'incorp.	concentration en GAL-^{3}H $\mu Ci.ml^{-1}$; $mg.ml^{-1}$	concentration en galactose $mg.ml^{-1}$		cinétiques étudiées	
			lavage	chasse	approv.	renouv.
GAL 1	5 mn	300 ; 0,008	0,8	0,4	oui	oui
GAL 2	8 mn	1000 ; 0,026	1,5	0,4	non	oui
GAL 3	15 mn	1000 ; 0,026	pas de chasse		oui	non
GAL 4	15 mn	1250 ; 0,032	1,3	0,65	oui	oui

2.) Etude morphologique et dynamique des résultats fournis par les différentes séries expérimentales.

a-/ Aux temps initiaux, la radioactivité apparaît dans les divers compartiments cellulaires (noyau, nucléole, cytoplasme, mitochondries). Les données numériques montreront que la densité granulaire du nucléoplasme est plus élevée que celle du

cytoplasme. Le cytoplasme apical et la membrane plasmique ne sont généralement pas radioactifs.

b-/ Après une incorporation de 8 minutes, c'est dans le compartiment golgien que la concentration en grains est la plus élevée. Les grains qui localisent les macromolécules marquées par le galactose-^{3}H couvrent généralement les structures sacculaires des dictyosomes (Pl. VI, fig. 1 et 2, série GAL 2). L'image autoradiographique consécutive à une incorporation de galactose tritié indique que le précurseur est mis en place sur les macromolécules intragolgiennes en cours de maturation. Nos observations sont donc en accord avec l'hypothèse d'intenses processus de galactosylation des glycoprotéines dans les appareils de Golgi. Il arrive cependant que, dès la 8e minute de l'expérience, certains dictyosomes soient marqués à leurs extrémités (Pl. VI, fig. 3, Série GAL 2) ou dans leur environnement immédiat (Pl. VI, fig. 4, Série GAL 2). Il peut s'agir d'expulsions précoces de produits intragolgiens galactosylés ou de processus de galactosylation dans le cytoplasme périgolgien.

L'AS des différentes sections de dictyosomes est très variable : certains dictyosomes sont fortement radioactifs alors que d'autres ne montrent pas de réaction autoradiographique. L'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle au sein de la population golgienne doit donc être envisagée en ce qui concerne les modalités d'utilisation de ce précurseur. Dans certaines conditions expérimentales (courte incorporation, série GAL 1) la distribution du marquage dans l'ensemble des sections de dictyosomes aux temps initiaux n'est pas conforme à une distribution théorique de Poisson : certains dictyosomes seraient donc des sites d'évènements métaboliques et cinétiques particuliers. Il en va de même pour les noyaux. Par con-

P L A N C H E V I

Localisation de la radioactivité liée au galactose tritié après incorporation du traceur par les cellules épithéliales.

Figures 1 et 2 : Après une incorporation de 8 minutes (Série GAL 2) la réaction autoradiographique est intense dans les appareils de Golgi. On remarque que la majorité des grains sont localisés sur les structures membranaires des saccules golgiens (x 15 000).

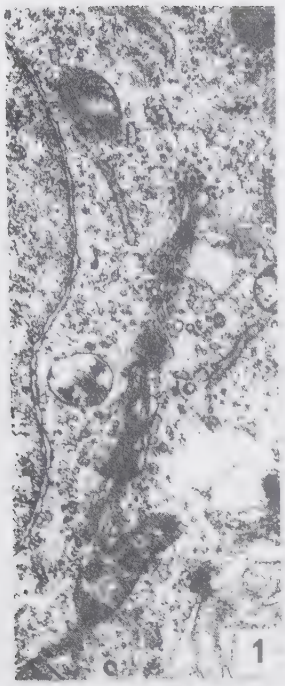
Figures 3 et 4 : A ce même temps, l'image autoradiographique apparaît parfois à l'extrémité des dictyosomes (fig. 3) ou dans l'environnement immédiat des saccules (fig. 4). Ces figures peuvent correspondre soit à des expulsions précoces de produits intra-golgiens galactosylés, soit à des galactosylations dans le cytoplasme périgolgien (voir texte). Noter que les arrangements polyribosomiaux ne sont pas marqués. (x 12 500 et 15 000).

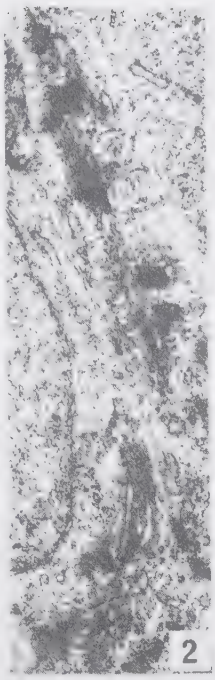
Figure 5 : 8 minutes d'incorporation suivies de 37 minutes de chasse (série GAL 2). La plupart des sections de dictyosomes sont démarquées (voir figure 7) et les grains sont alors localisés dans le cytoplasme apical des cellules. Le marquage semble correspondre à des macromolécules libérées dans le cytoplasme; des groupes de microvésicules (mv) ne sont pas radioactifs. (x 15 000).

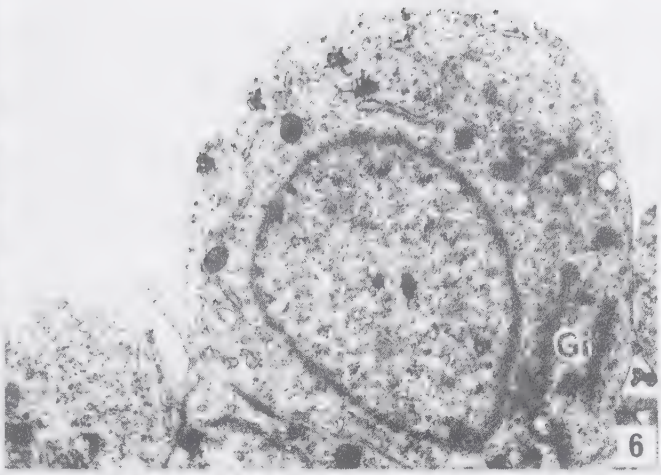
Figure 6 : 15 minutes d'incorporation suivies de 15 mn de chasse (série GAL 4). Cette illustration montre que dans certaines cellules les zones golgiennes demeurent radioactives alors que des grains d'argent marquent le cytoplasme apical : la réaction autoradiographique du cytoplasme périphérique ne provient donc pas obligatoirement du compartiment golgien (voir texte) (x 11 500).

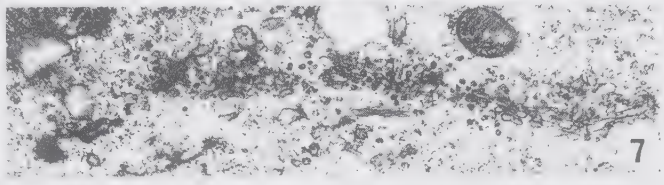
Figures 7 et 8 : Après un temps de chasse suffisant (fig. 7 , 8 mn d'incorporation + 22 mn de chasse , série GAL 2 et figure 8, 15 mn d'incorp. + 15 mn de chasse, série GAL 4) la plupart des sections de dictyosomes sont cependant démarquées, alors que la plus grande majorité des grains d'argent sont retrouvés dans le cytoplasme apical, sur la membrane plasmique et dans les boursouflures cellulaires (figure 8). Une fraction du marquage périphérique proviendrait donc des appareils de Golgi. (x 15 000 et x 11 500).

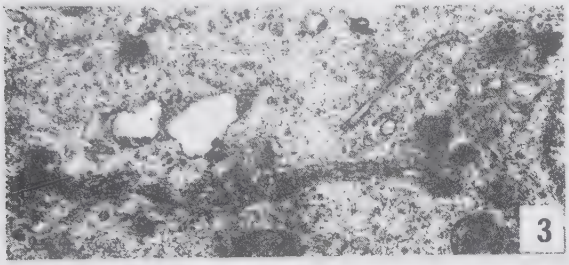
Figure 9 : A la 60e minute de l'expérience (série GAL 2), les cellules épithéliales ont généralement éliminé toute leur radioactivité. Quelques très rares grains révèlent vraisemblablement des macromolécules structurales stables. On remarque que le cytoplasme d'une CGP installée dans l'épithélium demeure par contre fortement radioactif (x 7 500).

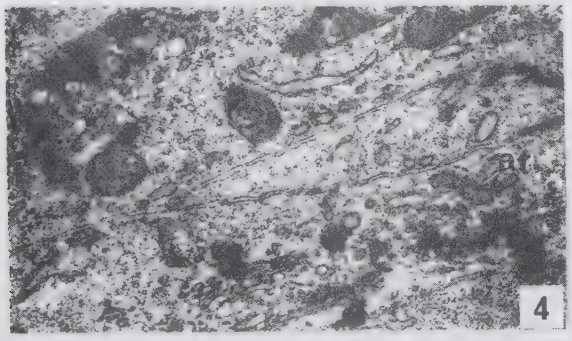

a
1

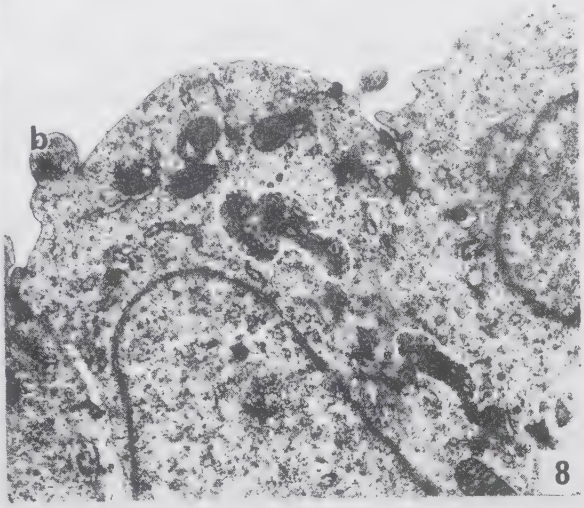

2


Gl
6

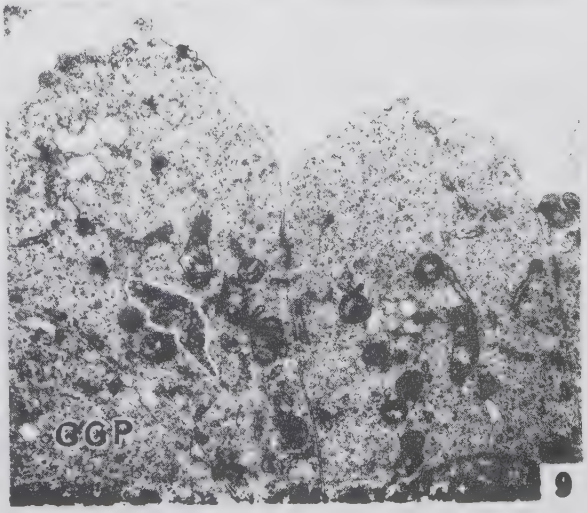

7


3


4


b
8

mv
5


GGP
9

tre, la répartition des grains dans la population mitochondriale est de type aléatoire, aux divers temps expérimentaux.

c-/ Au cours de l'expérience de chasse, la densité granulaire du compartiment golgien décroît rapidement (voir les preuves cinétiques plus loin). Dans le même temps, l'image autoradiographique apicale s'intensifie (Pl. VI, fig. 5, série GAL 2). La disparition des grains localisés dans le compartiment golgien et l'apparition du marquage dans le cytoplasme périphérique traduisent-elles un déplacement des produits intragolgiens galactosylés, en direction apicale ? Une telle filiation ne peut être aisément vérifiée du seul point de vue morphologique : d'une part, les évènements topochimiques qui se déroulent dans les différentes cellules épithéliales ne sont ni continus ni synchrones et l'expérimentateur ne peut avoir qu'une vue statistique de ces évènements ; d'autre part, des processus spécifiquement cytoplasmiques interviennent qui masquent ce simple transfert, et imposent une description nuancée des faits.

La figure 6 de la Planche VI correspond à une incorporation de 15 minutes, suivie d'une chasse de 15 minutes (série GAL 4). La zone golgienne est radioactive, les grains d'argent soulignant la périphérie des structures sacculaires. De telles images suggèrent que les dictyosomes libèrent leur contenu radioactif par un mécanisme d'expulsion rapide. Concomitamment, le cytoplasme apical montre une réaction autoradiographique : le renouvellement de macromolécules galactosylées cytoplasmiques qui ne transitent pas par les appareils de Golgi au cours de leur vie intracellulaire doit être envisagé. Dans cet ordre d'idée, soulignons que l'analyse cinétique

montre que la radioactivité renouvelée dans le seul compartiment golgien ne peut quantitativement rendre compte de tous les évènements qui se déroulent dans le cytoplasme. Il est nécessaire d'admettre l'existence de voies métaboliques cytoplasmiques indépendantes de l'itinéraire golgien.

Entre les 15e et 45e minutes de l'expérience, les observations morphologiques les plus nettes sont faites au niveau des appareils de Golgi. On assiste à un net appauvrissement du nombre de dictyosomes fortement radioactifs ; la proportion de sections à activité nulle augmente significativement (Pl. VI, fig. 7, Série GAL 2). Aux temps tardifs de l'expérience de chasse, la répartition des grains dans la population golgienne devient conforme à une distribution de Poisson. Sur la figure 8 de la Planche VI (Série GAL 4), on voit que les macromolécules radioactives sont principalement concentrées dans le cytoplasme apical et au niveau des boursouflures cellulaires. Les grains d'argent ne semblent pas être en relation avec un système de microvésicules et révèlent plutôt des glycoprotéines libérées dans l'espace cytoplasmique.

D'une façon générale, les structures stables ne montrent pas - ou peu - de radioactivité et le faible marquage de la membrane plasmique est fugace. Les produits galactosylés synthétisés par les cellules épithéliales ne sont donc pas retrouvés sur les systèmes membranaires, mais destinés à l'excrétion.

d-/Après un temps de chasse suffisant, (60e minute de l'expérience) la plus grande partie de la radioactivité des cellules épithéliales est éliminée (Pl. VI, fig. 9, série GAL 2). Seuls subsistent quelques rares grains qui correspondent vraisemblablement

à un faible marquage de molécules structurales stables. A ce même temps, les cellules germinales demeurent fortement radioactives dans un épithélium pratiquement démarqué (cf. 3e Partie).

3.) Etude cinétique des approvisionnements et des renouvellements. Nous avons analysé, dans les divers types d'expériences, les variations des AS des sections de cytoplasme, de noyaux et de dictyosomes, en fonction du temps.

a-/ Renouvellement de la radioactivité dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique. Les résultats numériques obtenus dans les séries expérimentales GAL 1 et GAL 2 sont consignés dans le Tableau V, et la représentation graphique des variations des activités spécifiques, en fonction du temps de chasse, fait l'objet du graphique V (a, : série GAL 2 ; b, : série GAL 1 ; voir explication du graphique V).

TABLEAU V

Activités absolues et spécifiques (Nb de gr. par $100\mu^2$) dans les ensembles des sections des compartiments nucléaire et cytoplasmique.

a. Série GAL 2 : incorporation de 8 mn ; 1000 μCi.ml^{-1}. (GRAPHIQUE V,a)

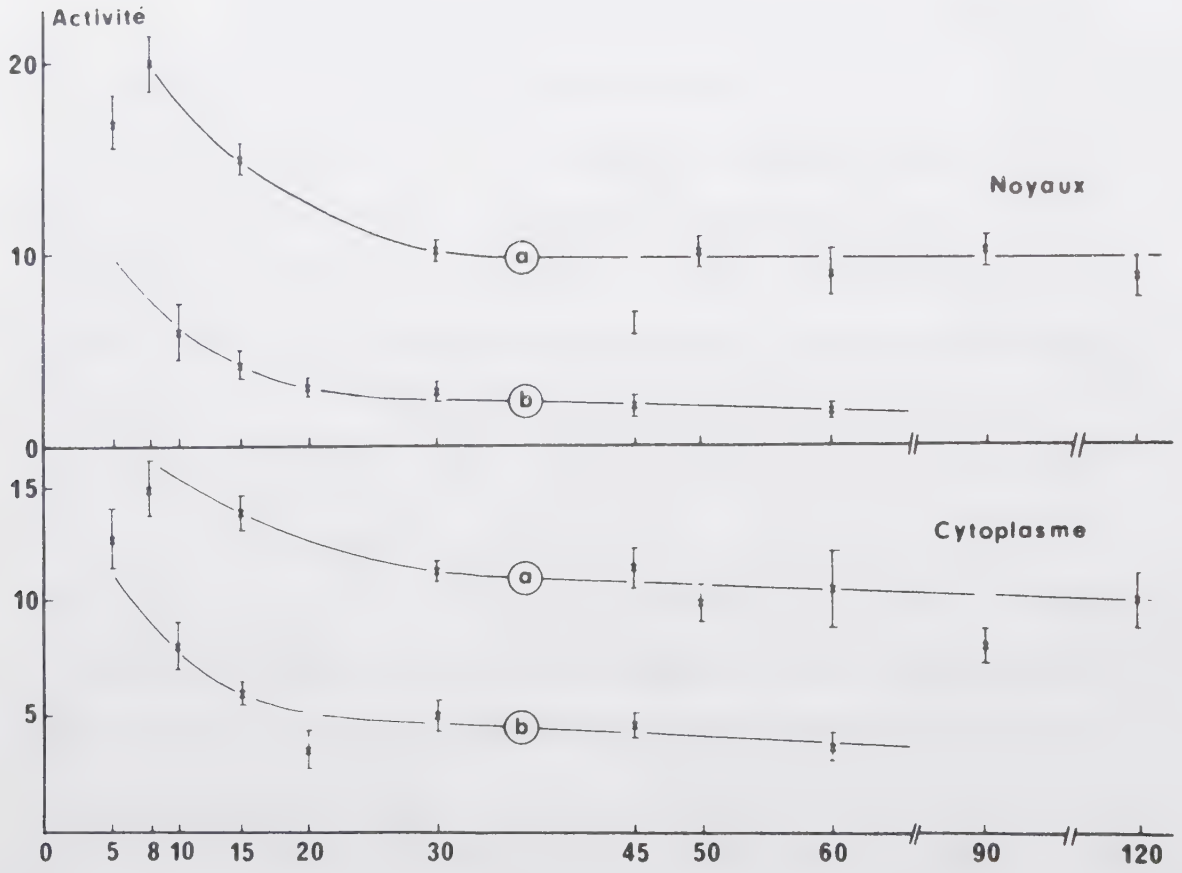
Temps (mn)		8	15	30	45	50	60	90	120
Noyaux	Surf.	4700	4360	4000	3700	4850	7100	2300	2540
	Act.	944	654	410	236	484	637	231	217
	AS.	20	15	10,2	6,4	10	9	10	8,5
Cyto.	Surf.	9600	10000	11000	8000	10700	17350	5660	7850
	Act.	1417	1379	1230	911	1010	1813	448	766
	AS	14,8	13,8	11,2	11,4	9,45	10,4	7,9	9,8

b. Série GAL 1 : incorporation de 5 mn ; 300μCi.ml^{-1}. (GRAPHIQUE V,b).

Temps (mn)		5	10	15	20	30	45	60
Noyaux	Surf.	4750	2880	814	3390	2300	355	1770
	Act.	814	172	34	98	66	7	31
	AS	17	6	4,2	3	2,9	2	1,75
Cyto.	Surf.	9800	7700	1700	8980	6250	970	4300
	Act.	1258	620	100	312	319	44	151
	AS.	12,8	8	5,85	3,5	5,1	4,5	3,5

G R A P H I Q U E V

Variations, en coordonnées normales, de l'activité spécifique des compartiments nucléaire et cytoplasmique, en fonction du temps de chasse, après incorporation de Galactose tritié.



Explication du graphique V. Dans le compartiment nucléaire, les données fournies par les séries GAL 2 (courbe a) et GAL 1 (courbe b) sont en bon accord. On remarque toutefois que dans cette dernière série, l'AS au temps 5 minutes prend une valeur relativement élevée, vraisemblablement due à un artéfact de fixation.
En ce qui concerne le cytoplasme, les nouveaux résultats obtenus à la suite d'une modification des conditions expérimentales (série GAL 1, courbe b) nous ont amené à modifier sensiblement l'interprétation, d'ailleurs nuancée, que nous avions avancée pour le renouvellement de l'activité cytoplasmique (D. CUMINGE et R. DUBOIS, 14, p. 305 et 311).
Pour la lecture graphique, voir texte. On a représenté la valeur de la déviation standard pour chaque point expérimental.

Commentaire du graphique V : Tandis que la cinétique de disparition des protéines nucléaires ne faisait apparaître qu'un seul taux de renouvellement dans des conditions expérimentales semblables à celles qui ont été employées avec le galactose-^{3}H, la courbe de variation de l'activité en grains d'argent sur l'ensemble des sections de noyaux fait apparaître ici deux processus cinétiques. Les taux de renouvellement peuvent être estimés à $12\%.mn^{-1}$ et $3,5\%.h^{-1}$. L'étude statistique de la répartition du traceur dans les noyaux montre que les dérogations aux prévisions théoriques de Poisson sont contemporaines de la coexistence des deux cinétiques de renouvellement. Cette observation suggère qu'il existe une hétérogénéité fonctionnelle au sein de la population nucléaire.

La courbe de renouvellement de la radioactivité dans le compartiment cytoplasmique, d'après les données fournies par la série GAL 1, (courbe b ; faible concentration du traceur ; court temps d'incorporation), fait nettement apparaître une portion incurvée, aux temps initiaux. Cette partie de la courbe générale traduit l'existence d'un processus de renouvellement dont l'intensité serait comprise entre 8 et $10\%.mn^{-1}$. Bien que les faits soient moins nets dans la représentation graphique des résultats obtenus pour la série GAL 2 (courbe a), une interprétation similaire peut être proposée. Dans un travail antérieur (D. CUMINGE et R. DUBOIS, 14) nous avions admis la possibilité de l'existence d'un processus de renouvellement unique et relativement lent de la radioactivité cytoplasmique. Il semble que la lecture graphique que nous proposons ici est plus conforme à la réalité. Elle s'accorde notamment avec les données obtenues par l'emploi du fucose-^{3}H, ainsi que nous le verrons plus loin.

c-/ Approvisionnement et renouvellement de la radioactivité dans l'ensemble des sections de dictyosomes. Dans toutes les séries expérimentales, la variation globale de la radioactivité dans le compartiment golgien exprime toujours la somme de deux processus cinétiques indépendants. Les faits observés avec le galactose tritié sont donc rigoureusement semblables à ceux décrits dans les expériences mettant en oeuvre la leucine-^{3}H (voir graphique III). Dans le cadre du présent travail, nous ne prendrons en considération que les processus cinétiques rapides en raison de leur intérêt particulier.

D'autre part, nous négligeons volontairement le développement des analyses cinétiques des données numériques brutes propres à chaque type d'expérience. Nous nous limitons à la présentation d'un tableau comparatif simplifié dans lequel figurent les valeurs des différents taux d'approvisionnement et de renouvellement (en $\%.mn^{-1}$) qui caractérisent les flux les plus intenses, lus graphiquement dans chaque série expérimentale. Nous rappelons les taux mesurés en présence de leucine-^{3}H.

Sur le graphique VI nous faisons apparaître, pour plus de précision, les variations de la radioactivité (exprimées en %) en fonction du temps d'incorporation et du temps de chasse. Le graphique VI complète donc le Tableau VI et doit être regardé comme un résumé interprétatif des résultats acquis dans des conditions expérimentales variées (voir page 64).

c-/ Interprétation des résultats morphologiques et cinétiques dans le compartiment golgien. L'emploi de leucine-^{3}H nous a permis de montrer que des précurseurs polypeptidiques d'origine cytoplasmique à turnover rapide alimentent certains dictyosomes, dans lesquels ils séjournent 7 mn. Par la mise en oeuvre du

TABLEAU VI

Tableau comparatif des intensités d'approvisionnement et de renouvellement au niveau du compartiment dans diverses conditions expérimentales.

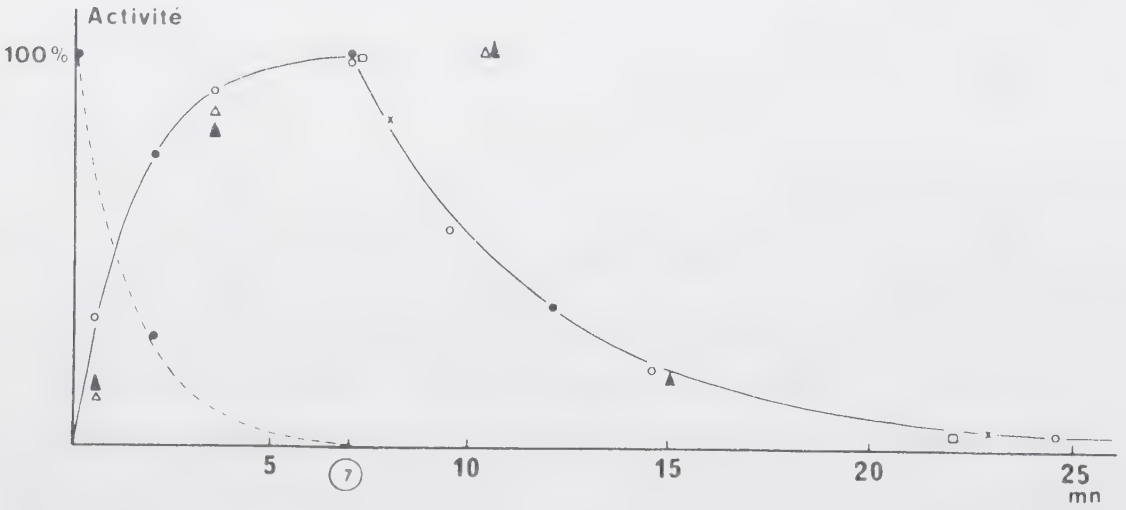
Nature du précurseur	Type d'expce	Renouvellement cytoplasme	Approvisionnnement golgis	Renouvellement golgis	Références
Leucine-^{3}H 200µCi.ml^{-1}	2 mn p.35	66 %.mn^{-1}	66 %.mn^{-1}	20 %.mn^{-1}	DUBOIS et CUMINGE, 30
Leucine-^{3}H 20 µCi.ml^{-1}	3 h. p.28	non mesuré	non mesuré	20 %.mn^{-1}	DUBOIS et CUMINGE, 30
Gal.-^{3}H 300µCi.ml^{-1}	5 mn GAL 1		64 %.mn^{-1}	20 %.mn^{-1}	DUBOIS, 25
Gal.-^{3}H 1000µCi.ml^{-1}	8 mn GAL 2		non mesuré	20 %.mn^{-1}	CUMINGE et DUBOIS, 14
Gal.-^{3}H 1000µCi.ml^{-1}	15 mn GAL 3		58 %.mn^{-1}	non mesuré	DUBOIS, 25
Gal.-^{3}H 1250µCi.ml^{-1}	15 mn GAL 4		53 %.mn^{-1}	(20%.mn^{-1}) extrapolé	DUBOIS, 25 et à paraître 27

galactose-^{3}H, nous faisons des observations similaires. Certaines sections de dictyosomes incorporent intensément le traceur. De plus, les cinétiques d'approvisionnement et de renouvellement coïncident et les temps de séjour intragolgien sont égaux. Ces faits sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les appareils de Golgi sont des sites d'intense galactosylation des glycoprotéines en voie de maturation. Si l'on considère l'ensemble de la population golgienne, il apparaît que l'intensité du flux d'approvisionnement du compartiment golgien en protéines néosynthétisées agit comme facteur limitant de l'incorporation de galactose. Après une période intragolgienne de 7 mn, les produits galactosylés sont renouvelés au taux de 20%.mn^{-1} et libérés dans l'espace cytoplasmique.

4.) Conclusion. Les modalités d'incorporation du galactose-^{3}H par les épithéliums germinatifs permettent de mettre en

G R A P H I Q U E V I

Variations, en coordonnées normales, de la radioactivité liée au galactose tritié, en fonction du temps d'incorporation et du temps de chasse, comparées à l'expression graphique des résultats obtenus en présence de leucine tritiée (courbes de charge et de décharge dans l'ensemble des sections de dictyosomes.



Explication du graphique VI : La courbe en trait interrompu, représente le renouvellement du pool des précurseurs cytoplasmiques à destination golgienne (leucine tritiée ; 66% par mn). La courbe ascendante en trait plein traduit l'approvisionnement du compartiment golgien, par transfert de ces précurseurs cytoplasmiques, dans le même temps (leucine tritiée ; 66% par mn). La courbe descendante en trait plein exprime le renouvellement des produits de transformation intragolgiens (leucine tritiée ; 20% par mn). Le temps de séjour minimal intragolgien égale 7 mn. Les points (●) rappellent, en valeur relative (% de l'activité soumise au turnover rapide), les mesures faites dans les séries expérimentales basées sur l'emploi de la leucine tritiée. Dans les différents types d'expériences mettant en oeuvre le galactose tritié, on a vérifié que le temps de séjour intragolgien est également de l'ordre de 7 mn. En choisissant une origine commune sur l'axe des temps, et en exprimant les variations de la radioactivité en % pour plus de commodité de lecture, on voit que les données recueillies dans les différentes séries expérimentales sont en bonne conformité avec le tracé graphique qui traduit les caractéristiques cinétiques des flux d'entrée et de sortie des substances protéiniques transitant par le compartiment golgien.
(o) : série GAL 1 ; (x) : série GAL 2 ; (△) : série GAL 3 ; (▲) : série GAL 4. Les points indiqués par (▭) correspondent à une longue incorporation de leucine (cf. page 28).

évidence, en accord avec les résultats acquis dans d'autres systèmes, le rôle des appareils de Golgi dans la galactosylation de complexes de nature vraisemblablement glycoprotéique. Quelques observations d'ordre morphologique sont en faveur de l'existence d'un transfert de produits de transformation intragolgiens vers les boursouflures et la périphérie cellulaire. Cependant, les preuves cinétiques et quantitatives d'un tel transfert n'ont pu être établies. En effet, la lecture graphique permet de calculer que la libération, dans le cytoplasme, de la radioactivité intragolgienne rapidement renouvelée ne représente que 11 % (Série GAL 2) ou 12,5 % (Série GAL 1) de la radioactivité cytoplasmique. Malgré une nette amélioration de cette donnée, comparativement à celle obtenue avec la leucine-^{3}H (2%), elle demeure faible et ne permet pas de suivre électivement la destinée des produits intragolgiens après leur expulsion dans le cytoplasme.

Les complexes macromoléculaires radioactifs retrouvés dans le compartiment cytoplasmique méritent une attention particulière. Il est établi que, du double point de vue quantitatif et chronologique, cette radioactivité cytoplasmique ne peut provenir des appareils de Golgi. D'autre part, une fraction importante de cette radioactivité est éliminée aux temps initiaux (cf. graphique V, courbe b) soit par turnover in situ, soit par diffusion à travers la membrane plasmique (Pl. VI, fig. 6) et ne transite pas par les dictyosomes. S'agit-il d'une voie de synthèse glyocoprotéique essentiellement cytoplasmique ? En raison des conversions multiples que le galactose peut subir dans le métabolisme cellulaire, il n'est pas possible de répondre à cette question.

En résumé, ces expériences n'ont pas permis d'apporter les preuves que nous recherchions d'une filiation directe entre les complexes glycoprotéiques intragolgiens et les substances excrétées par les épithéliums germinatifs.

Cette hypothèse demeure néanmoins vraisemblable et l'emploi de fucose-^{3}H devrait permettre de vérifier la nature glycoprotéique de certaines substances excrétées par les épithéliums germinatifs attractifs.

II. - INCORPORATION de FUCOSE TRITIE, en CULTURE ORGANOTYPIQUE et ROLE des APPAREILS de GOLGI.

Ainsi, l'étude comparative des sites d'incorporation, des voies de migration intracellulaires, des modalités de transfert et de renouvellement de la radioactivité liée à la leucine-^{3}H ou au galactose-^{3}H conduit à penser qu'une fraction des substances excrétées par les épithéliums germinatifs sont des complexes glycoprotéiques.

Toutefois, le galactose-^{3}H peut subir de nombreuses conversions biochimiques dans des voies métaboliques diverses, - y compris celle des acides aminés -, et il présente le grave inconvénient de manquer de spécificité pour l'étude élective de la seule synthèse glycoprotéique. Divers travaux biochimiques ont montré que le GDP-L-Fucose est un excellent précurseur des glycoprotéines (J.W. COFFEY et all., 13 ; J. BEKESI et R. WINZLER, 2 ; R.L. KAUFMAN et V. GINSBURG, 45). Cette molécule est métaboliquement stable et ne subit pas, - ou peu -, de transformation épimérasique (H.B. BOSMANN et all., 6). Il nous a donc paru très intéressant de voir si le fucose était incorporé par les épithéliums germinatifs et de suivre les voies de migration intracellulaires des glycoprotéines révélées par la présence de ce traceur).

Par ailleurs, l'emploi de fucose-^{3}H devrait permettre d'apporter des précisions sur les aspects de la biosynthèse glycoprotéique. En effet, pour quelques auteurs qui ont travaillé avec les techniques autoradiographiques de haute résolution, les activités galactosyl-transférases et fucosyl-transférases se situent exclusivement dans le système endomembranaire des seuls appareils de Golgi (G. BENNETT, 3 ; G. BENNETT et C.P. LEBLOND, 4, 5 ; A. HADDAD et all., 42 ; A. RAMBOURG et all., 64 ; A. WEINSTOCK et C.P. LEBLOND, 72 ; A. WEINSTOCK et all., 73 ; P. WHUR et all., 77). Par contre, certaines données obtenues par l'analyse biochimique des fractionnements, ne sont pas en accord avec une conclusion aussi tranchée : une fraction du fucose serait mise en place en dehors des appareils de Golgi, dans la phase cytoplasmique non particulaire (J. FROT-COUTAZ et all., 38).

Dans cette partie de notre travail, nous nous attacherons à l'étude de la biosynthèse glycoprotéique et à la description des aspects topochimiques des fucosylations terminales de ces biomolécules. En raison de l'activité métabolique de certains appareils de Golgi, nous serons amené à accorder une attention particulière aux évènements qui se produisent dans le compartiment golgien.

1.) Protocole expérimental. Les expériences sont faites sur les régions gonadiques isolées, cultivées sur milieu de Wolff et Haffen enrichi en fucose radioactif (incorporation) ou en fucose froid (chasse). Le précurseur est le L-Fucose-^{3}H (AS = 4,3 Ci/mmole ; New England Nuclear). La concentration radioactive dans le milieu de culture est de 1250 $\mu Ci.ml^{-1}$, ce qui correspond à 0,047 mg de fucose par ml de milieu. Après un lavage rapide dans le liquide de Tyrode enrichi en fucose non radioactif (1,9 $mg.ml^{-1}$), l'expérience de chasse commence sur des milieux contenant le précurseur froid à la concentration de 0,950 mg par ml de milieu (D. CUMINGE et

P L A N C H E V I I

Sites d'incorporation du fucose-^{3}H et localisations intracellulaires des glycoprotéines marquées par ce traceur.

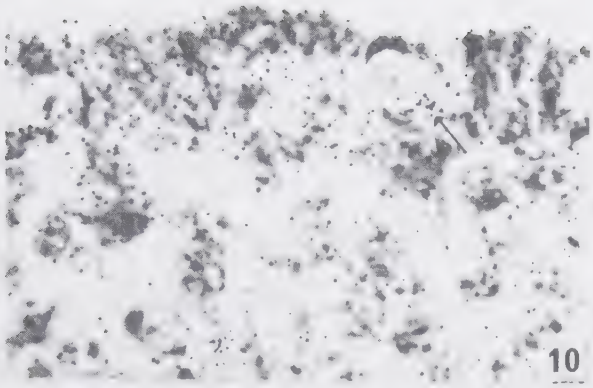
Figure 10 : Explant cultivé 17 minutes sur milieu radioactif (1250 µCi/ml), puis fixé par l'alcool acétique. Hydrolyse par le PCA. Les grains révèlent les glycoprotéines marquées par le fucose-^{3}H, distribuées dans les divers compartiments cellulaires. Une CGP (⟶) montre une forte concentration de grains dans la zone périnucléaire qui correspond vraisemblablement à l'appareil de Golgi. (x 1100).

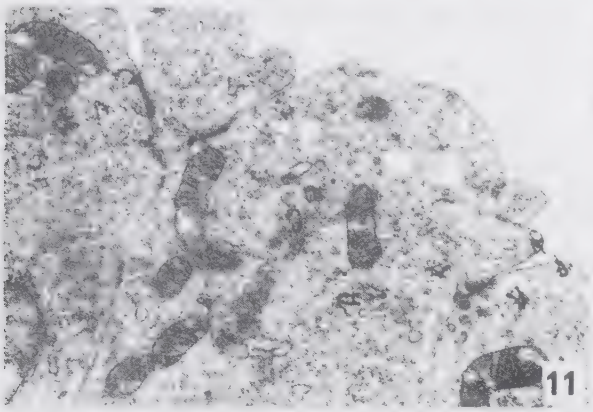
Figure 11 : Après 5 minutes d'incorporation, une faible réaction autoradiographique apparaît dans le cytoplasme et la zone golgienne. Noter que les membranes plasmiques et les structures stables ne sont pas marquées. (x 11 500).

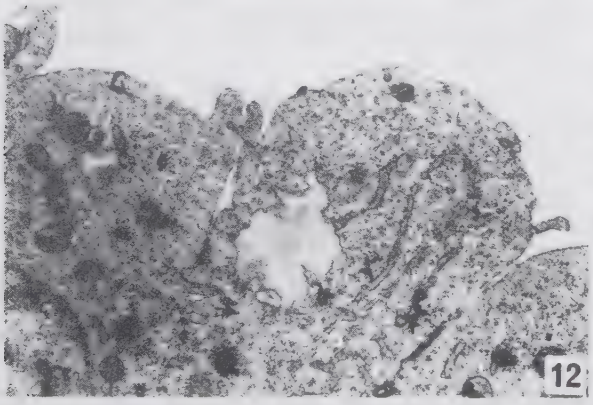
Figure 12 : Après 10 minutes d'incorporation, la distribution des grains est semblable à celle observée sur l'illustration précédente, mais la densité granulaire est plus forte dans les différents compartiments cellulaires. Absence de marquage dans l'ergastoplasme granulaire. (x11 500).

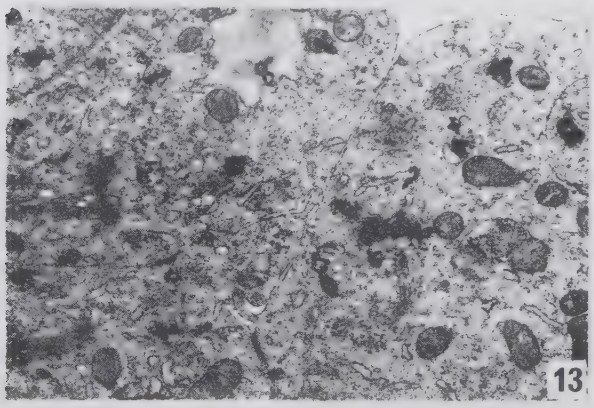
Figure 13 : Après 17 minutes d'incorporation, la réaction autoradiographique la plus intense est observée aux extrémités de certains dictyosomes. Malgré un contact prolongé avec le précurseur, les structures stables ne montrent pas de grains d'argent (x 12 000).

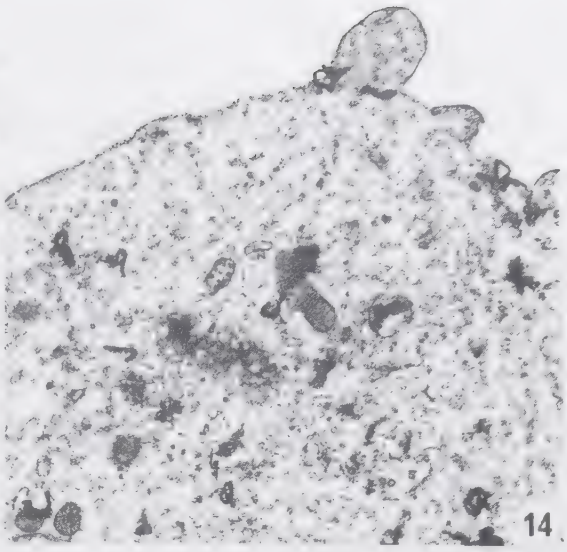
Figures 14, 15 et 16 : 17 minutes d'incorporation. Détails sur les aspects de l'image autoradiographique au pôle apical des cellules épithéliales. La radioactivité peut apparaître d'emblée au pôle apical de certaines cellules, notamment au niveau des boursouflures (fig. 14) et sur la membrane plasmique (fig. 15 et 16). Parfois, des groupes de microvésicules sont fortement marqués par le traceur (mv, fig.16) (x 15 000 ; x 15 000 et x 22 500).

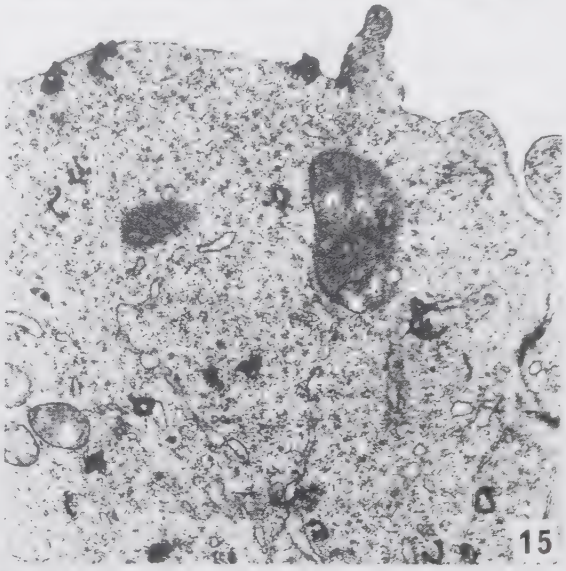

10

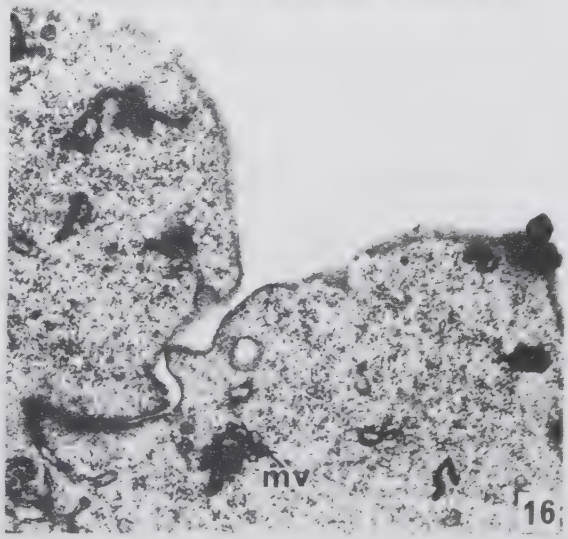

11


12


13


14


15


mv
16

R. DUBOIS, 15, 16).

2.) Etude morphologique dynamique.

a-/ Incorporation du fucose tritié : Dès les 5 premières minutes de culture sur le milieu radioactif, la réaction autoradiographique est discrète, mais elle apparaît dans tous les compartiments cellulaires (Pl.VII, fig. 11). Après 10 minutes (Pl. VII, fig. 12) et 17 minutes (Pl. VII , fig. 13), la densité granulaire s'intensifie, la distribution des grains ne variant pas sensiblement. La majorité des grains sont localisés dans le cytoplasme et les plus fortes concentrations sont rencontrées dans la proximité des sections de certains dictyosomes : une intense réaction autoradiographique marque fréquemment l'une des extrémités de ces organites (Pl. VII, fig. 13 et Pl. IX, fig. 26). Certaines zones de la membrane plasmique apicale et quelques boursouflures cellulaires sont préférentiellement marquées (Pl. VII, fig. 14 et 15). En ce qui concerne le marquage cytoplasmique, les grains sont parfois localisés sur des groupes de vésicules (Pl. VII, fig. 16) mais le plus souvent ils apparaissent dispersés dans le cytoplasme. Lorsque le temps d'incorporation est prolongé jusqu'à la 30e minute (Pl. VIII, fig. 17), et jusqu'à la 60e minute (Pl. VIII, fig. 18), on voit que l'image autoradiographique ne diffère pas sensiblement de celle observée après 17 minutes d'incorporation continue. Ceci conduit à penser que les cinétiques d'apparition du traceur atteignent des valeurs voisines de l'activité à l'équilibre dès les 15 première minutes de culture (turnover intense et continu des macromolécules marquées ; voir graphique VII).

D'autre part, on note que d'une façon générale un contact prolongé avec le précurseur n'entraîne pas de marquage des structures stables telles les barres terminales, les desmosomes, les membranes plasmiques latérales (Pl. VII, fig. 13 à 16 et Pl. VIII, fig. 17). Toutefois, après une incorporation continue de 60 minutes,

quelques grains apparaissent sur des structures membranaires qui ne sont pas radioactives aux temps initiaux (membranes des saccules golgiens et membranes plasmiques latérales, Pl. VIII, fig. 18 et Pl. IX, fig. 30).

Enfin l'image autoradiographique persiste après l'action de l'alcool acétique et du liquide de Bouin employés comme fixateurs, et après une hydrolyse menagée des coupes par le PCA à 5% pendant 1/2 heure à 8° C. (Pl. VII, fig. 10).D'après les résultats de l'autoradiographie optique, nous pouvons conclure que la radioactivité mise en évidence après la fixation par OsO_4 correspond bien à des glycoprotéines ayant incorporé le fucose-^3H. Ceci est en accord avec une observation de S. BUSSON-MABILLOT (8, 9), d'après laquelle le tétroxyde d'osmium préserve le matériel glycoprotéique non lié aux membranes mieux que les fixateurs aldéhydiques, tenus pour responsables d'une solubilisation excessive.

b-/ Expérience de chasse. Pour des raisons de commodité au cours des opérations expérimentales, l'étude de la disparition de la radioactivité ne commence pas à partir de la 17e minute, mais à partir de la 15e minute de l'incorporation (Tableau VII; graphique VII).

Après 1 minute 1/2 de chasse (lavage dans le tyrode), la concentration en grains d'argent demeure importante, notamment, dans le cytoplasme périphérique et le nucléoplasme (Pl. VIII, fig. 19). Dans certains cas favorables, on voit que des glycoprotéines radioactives sont éliminées par l'éclatement des boursouflures cellulaires.

Après 15 minutes de chasse sur le milieu enrichi en précurseur non radioactif (30e minute de l'expérience), la réaction autoradiographique est considérablement affaiblie (Pl. VIII, fig. 20, 21 et 22). Si l'on considère la distribution du marquage d'un point de vue glo-

bal, on constate que la grande majorité des zones golgiennes ne sont plus radioactives et que la plupart des grains d'argent qui subsistent à ce temps sont retrouvés dans le cytoplasme apical. Ceci suggère que la radioactivité d'origine golgienne gagne la périphérie des cellules avant d'être excrétée (Pl. VIII, fig. 20 et 21).

Mais cette voie de transit des glycoprotéines n'est pas unique. En effet, nous retrouvons, - de même qu'en présence de galactose-^{3}H -, des preuves d'une biosynthèse glycoprotéique dans l'espace cytoplasmique, indépendamment du transfert intragolgien. A ce temps de l'expérience de chasse, il n'est pas rare de voir un marquage apical dans les cellules épithéliales dont les dictyosomes demeurent fortement radioactifs (Pl. VIII, fig. 22) et dont la zone cytoplasmique intermédiaire ne montre pas de radioactivité. D'autre part, le marquage cytoplasmique aux temps initiaux de l'incorporation ne peut, pour des raions d'ordre chronologique, avoir une origine golgienne (Pl. VII, fig. 11). Mais surtout, l'analyse graphique des données numériques (voir plus loin) montre sans ambiguité que la quantité de radioactivité provenant de la sphère golgienne ne peut rendre compte à elle seule de l'intensité des processus cinétiques qui se déroulent dans l'espace cytoplasmique.

Enfin, sur le plan local on constate l'évidence d'un asynchronisme (donc d'une rythmicité) dans le fonctionnement des cellules et organites : après 15 minutes de chasse, certaines sections de dictyosomes sont fortement radioactives alors que d'autres ont une activité spécifique nulle (Pl. VIII, fig. 21) ; la figure 22 illustre la même différence au niveau cellulaire.

P L A N C H E V I I I

Localisations intracellulaires des glycoprotéines marquées par le fucose-^{3}H (suite).

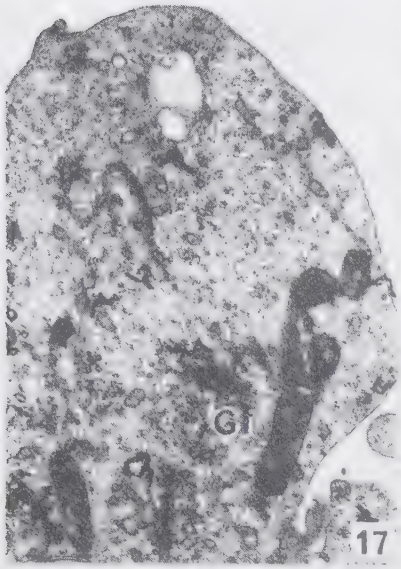
Figures 17 et 18 : Après 30 minutes de culture (fig. 17) et 60 minutes de culture (fig. 18) en présence de précurseur tritié, l'intensité de la réaction autoradiographique demeure sensiblement stable (équilibre isotopique). On remarque notamment que les structures membranaires ne sont généralement pas radioactives (x 15 000).

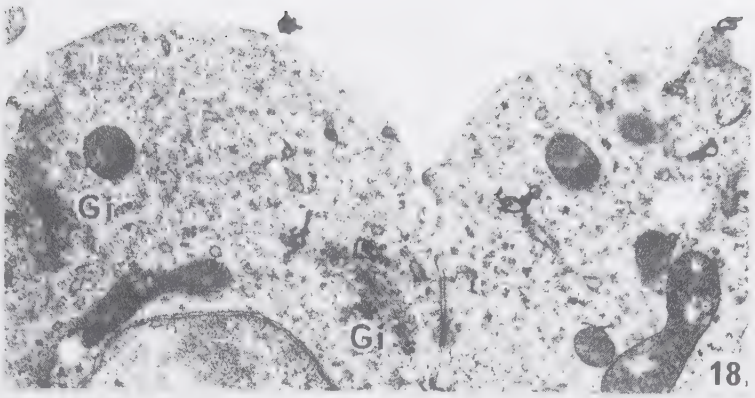
Figure 19 : 15 minutes d'incorporation suivies de 1,5 minute de chasse. La concentration en grains d'argent est importante dans le cytoplasme apical et le noyau. On voit qu'une boursouflure expulse, à ce temps initial de l'expérience de chasse, son contenu radioactif dans le coelome (x 7000).

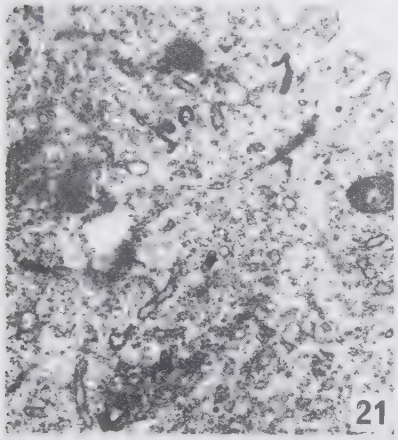
Figures 20 et 21 : Après 15 minutes de chasse (30e minute de l'expérience) la réaction autoradiographique s'est nettement affaiblie. De nombreuses zones golgiennes ne sont plus radioactives et les grains qui subsistent sont principalement retrouvés dans le cytoplasme périphérique. Certains dictyosomes demeurent intensément marqués alors que d'autres ont expulsé leurs produits radioactifs (fig. 20 et détail 21, et suivante). (x 6 200 et 12 000).

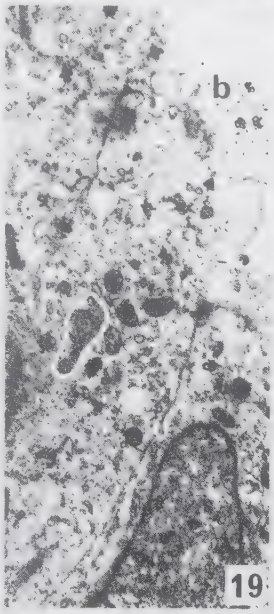
Figure 22 : Même temps que précédemment. Intense réaction autoradiographique dans la zone golgienne et marquage contemporain du cytoplasme apical dans une cellule épithéliale, au cours de l'expérience de chasse. Une cellule voisine a éliminé la quasi totalité de sa radioactivité ; seules les structures stables (membranes latérales) montrent un discret marquage (x 11 500).

Figures 23 et 24 : Après 45 minutes de chasse (60e minute de l'expérience), la grande majorité des glycoprotéines marquées par le fucose tritié sont renouvelées au niveau des cellules épithéliales. On notera que, à ce temps tardif de l'expérience de chasse, la densité granulaire demeure très élevée dans certains noyaux (figure 23). Les quelques rares grains retrouvés dans le corps cellulaire sont localisés sur les structures membranaires stables (fig. 24). (x 6200 et x 11 500).

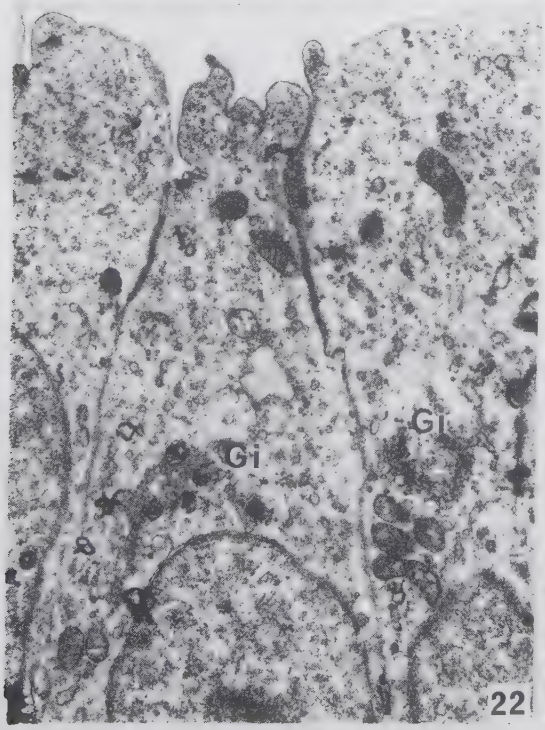

Gi
17

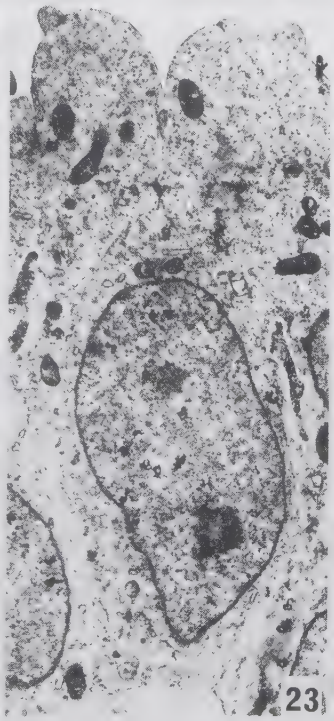

Gi
Gi
18

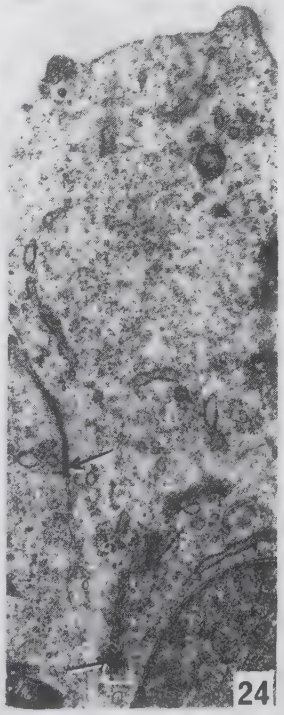

21


b
19

20


Gi
Gi
22


23


24

A la 45e minute de chasse, les zones golgiennes et le cytoplasme périphérique ont une AS nulle ou ne montrent qu'une très faible réaction autoradiographique. Les épithéliums germinatifs apparaissent pratiquement démarqués, exception faite de quelques sections de noyaux au niveau desquels la densité granulaire demeure élevée (Pl. VIII, fig. 23). Ainsi, après un temps de chasse suffisant (60e minute de l'expérience, Pl. VIII, fig. 24) la radioactivité du cytoplasme est négligeable, la grande majorité des macromolécules cytoplasmiques et golgiennes marquées par le traceur ayant été totalement renouvelées. Seuls subsistent quelques très rares grains, le plus souvent retrouvés sur les membranes plasmiques latérales et sur les saccules golgiens ; ils révèlent vraisemblablement la présence de glycoprotéines structurales stables.

c-/ Etude de la localisation de la réaction autoradiographique au niveau des zones golgiennes, à différents temps de l'expérience.

Il est remarquable que les grains d'argent qui localisent les macromolécules ayant incorporé le fucose-^{3}H sont régulièrement retrouvés aux extrémités ou dans l'environnement immédiat des sections de dictyosomes. Les structures membranaires des saccules sont rarement, ou faiblement marquées.

Rappelons que de telles images ont été observées, après l'emploi de galactose-^{3}H. Elles caractérisaient cependant la fin de la période d'incorporation et la période de chasse. Puisque, aux temps initiaux, les grains qui révèlaient les produits intragolgiens galactosylés couvraient les structures sacculaires (Pl. VI, fig. 1 et 2), nous avions expliqué le marquage périgolgien par l'effet d'expulsions spontanées des macromolécules galactosylées (Pl. VI, fig. 3 et 4).

P L A N C H E I X

Incorporation du fucose-^{3}H au niveau des appareils de Golgi.

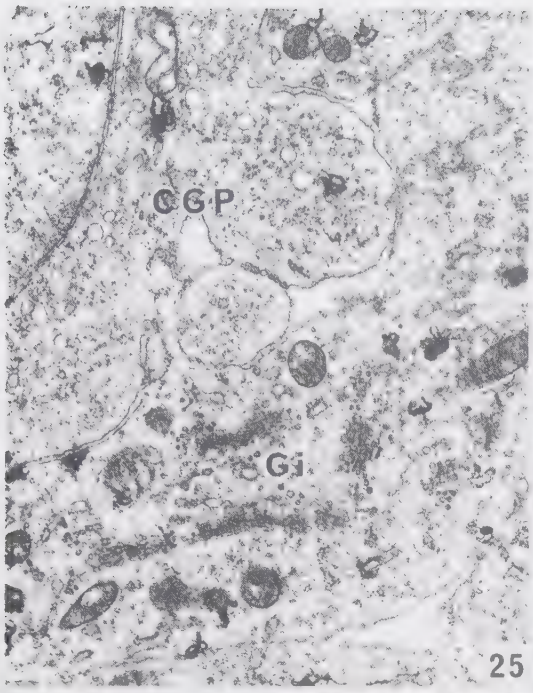
Figure 25 : Incorporation de 5 minutes. Discrète réaction autoradiographique dans le cytoplasme périgolgien. Les structures sacculaires ne sont pas marquées. Noter que le traceur apparaît d'emblée dans le cytoplasme pseudopodial d'une cellule germinale dès ce temps précoce. (x 15 000).

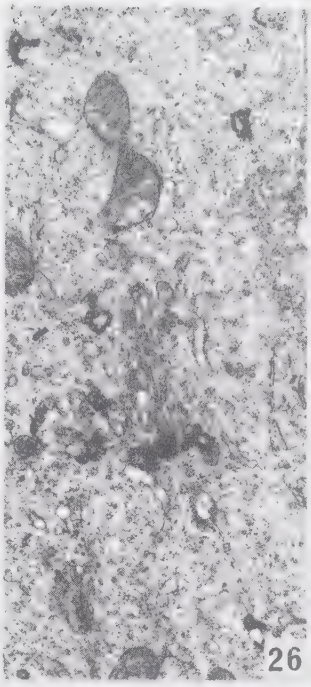
Figures 26 et 27 : Incorporation de 17 minutes. les glycoprotéines marquées par le traceur sont concentrées à l'une des extémités d'un dictyosome (fig. 26) ou dans l'environnement cytoplasmique immédiat des structures sacculaires (fig. 27) (x 15 000).

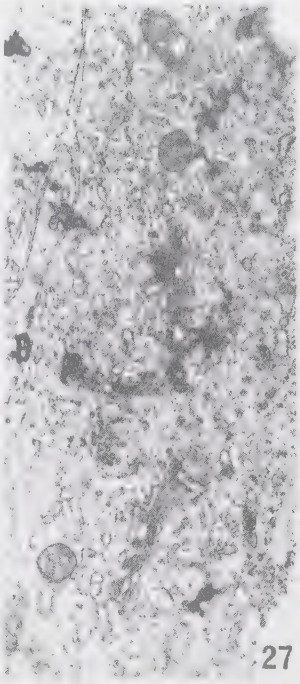
Figure 28 : Cette illustration correspond à une culture continue en présence du fucose-^{3}H pendant 30 minutes. Dans la zone golgienne, les grains épargnent les structures membranaires du complexe golgien. L'intensité de la réaction autoradiographique n'a pas sensiblement varié entre les 17e et 30e minutes d'incorporation. (x 19 000).

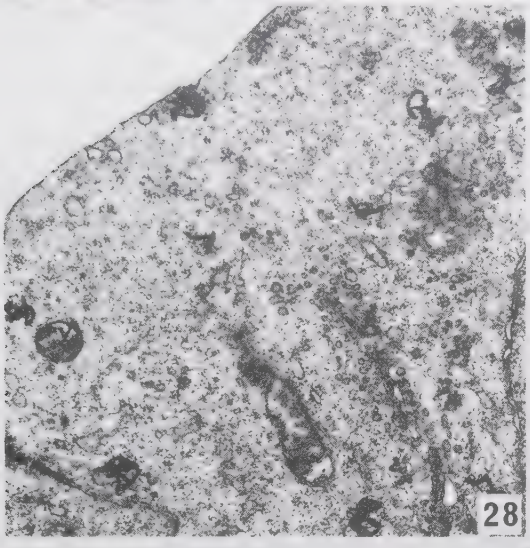
Figures 29 et 30 : Culture de 60 minutes sur milieu radioactif. Malgré un très long temps d'incorporation, l'image autoradiographique respecte les structures membranaires des saccules et les grains sont concentrés dans le cytoplasme périgolgien (fig. 29). Dans certains dictyosomes, quelques grains apparaissent sur les saccules (fig. 30). Rappelons que les images autoradiographiques consécutives à une incorporation de leucine-^{3}H ou de galactose-^{3}H couvrent régulièrement les saccules golgiens (voir Pl. IV, fig. 23 et 24 et Pl. VI, fig. 1 et 2) (x 15 000 et x 11 000).

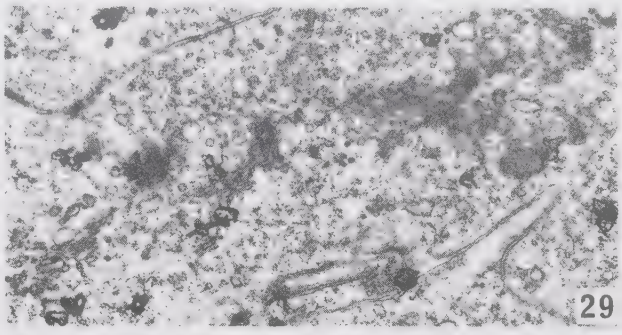
Figures 31 et 32 : Incorporation de 15 minutes suivie d'une chasse de 165 minutes. Une nouvelle onde de marquage apparaît dans les appareils de Golgi (graphique VII, ⟶) et les grains couvrent les structures sacculaires (fig. 31). Il s'agit vraisemblablement d'une réincorporation, par les cellules épithéliales, de glycoprotéines radioactives provenant des cellules germinales (fig. 32). Voir commentaire dans le texte. (x 15 000).

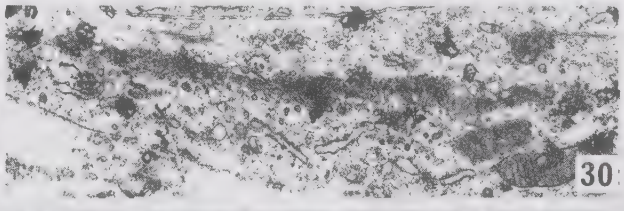

CGP
Gi
25

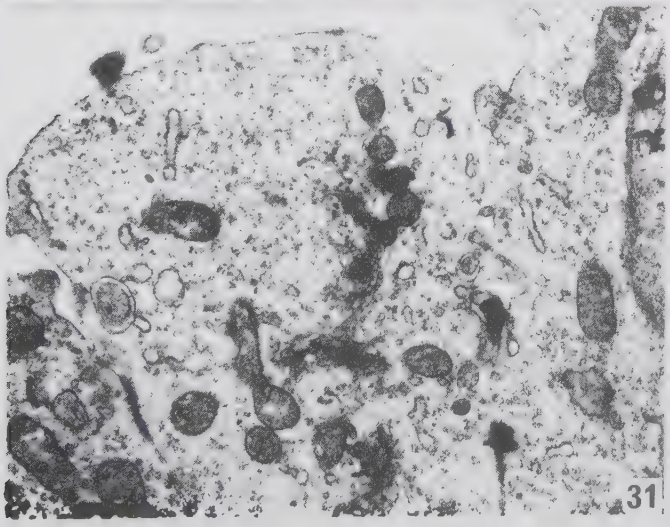

26

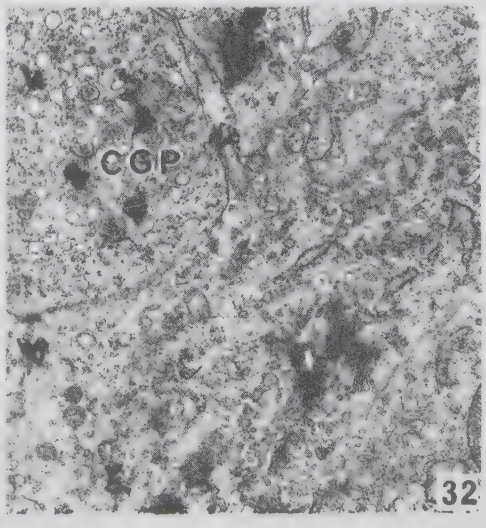

27


28


29


30


31


CGP
32

En ce qui concerne les sites d'incorporation du fucose, les faits sont différents, ainsi que nous le montrons de façon détaillée par la Planche IX. On voit que le fucose-^{3}H n'apparaît que discrètement, dans les 5 premières minutes de l'expérience, au niveau des zones golgiennes (Pl. IX, fig. 25). Après 17 minutes de culture continue en présence du traceur, la réaction autoradiographique est souvent très intense aux extrémités et dans l'environnement immédiat de certains dictyosomes (Pl. IX, fig. 26 et 27). Mais d'une façon générale, elle tend à épargner les structures sacculaires. Il en va de même si l'incorporation porte sur une durée de 30 minutes (Pl. IX, fig. 28), ou de 60 minutes (Pl. IX, fig. 29). Ces images autoradiographiques montrent bien qu'après une culture prolongée en présence de fucose-^{3}H, la plupart des grains d'argent retrouvés dans la sphère golgienne épargne les structures sacculaires et soulignent plutôt le contour immédiat des sections de dictyosomes. En d'autres termes, il n'est pas possible de mettre en évidence, dans des conditions expérimentales pourtant favorables, une étape intragolgienne des macromolécules marquées par le fucose-^{3}H. Nos résultats suggèrent qu'au niveau de la sphère golgienne, le fucose-^{3}H serait préférentiellement mis en place à l'extérieur des structures dictyosomales.

Aux temps les plus tardifs de l'expérience d'incorporation, il arrive cependant que des grains d'argent plus nombreux couvrent les structures sacculaires de certains dictyosomes (Pl. IX, fig. 30). Il en va de même lorsqu'une incorporation de courte durée (15 minutes) est suivie d'une longue période de chasse (3 heures). On assiste alors à une nette augmentation de la radioactivité dans le compartiment golgien (voir graphique VII), les grains d'argent couvrant cette fois les structures sacculaires (Pl. IX, fig. 31).

L'expérience de chasse étant conduite en présence d'une forte concentration de précurseur froid, il est exclu que cette nouvelle onde de radioactivité corresponde à des fucosylations intragolgiennes. Il s'agit plus vraisemblablement d'une réutilisation par les cellules épithéliales, de produits macromoléculaires préalablement marqués par le fucose-^{3}H et provenant des cellules germinales qui demeurent longtemps fortement radioactives dans un épithélium pratiquement démarqué (Pl. IX, fig. 32).

3.) Données numériques et interprétation graphique des résultats quantitatifs globaux.

L'ensemble des données numériques fait l'objet du Tableau VII, dans lequel les valeurs moyennes des AS dans les différents compartiments étudiés sont accompagnées de la déviation-standard.

TABLEAU VII

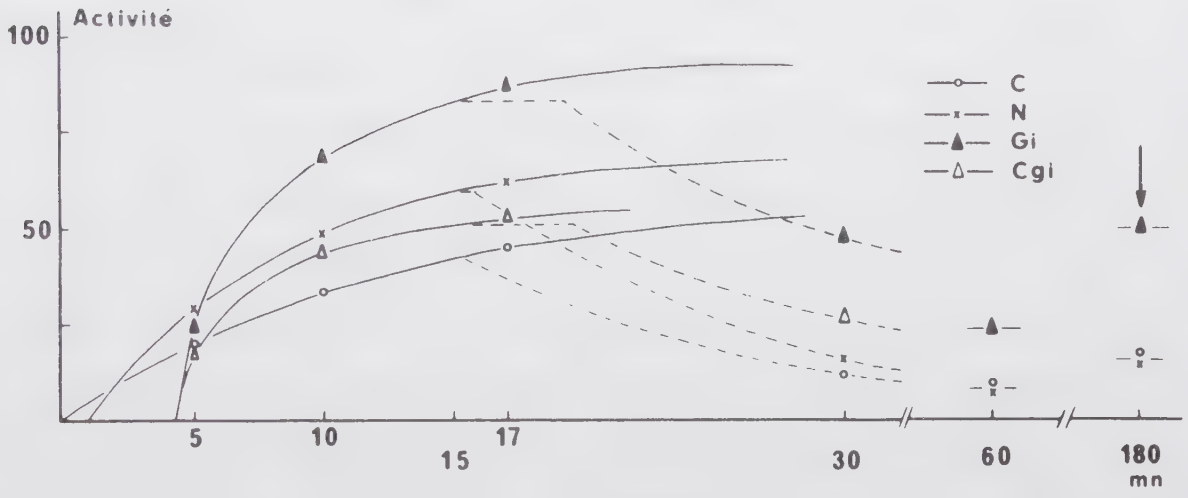
Activités totales et AS (nbre gr./100u^{2}) des différents compartiments cellulaires dans des expériences mettant en oeuvre le fucose-^{3}H.

TEMPS		5 mn ← Incorporation →	10 mn	17 mn	30 mn	60 mn	180 mn
				15 mn ← Chasse →			
Noyau	Surface	4295	3887	7485	7545	3550	2955
	Activité	1222	1897	4669	1157	340	440
	AS	28,5±3,7	49±1,6	62,5±5	15,5±1,3	8,8±0,7	14,9±1,8
Cytopl.	Surface	8493	9505	13485	13855	8265	6495
	Activité	1607	3134	6076	1548	628	1057
	AS	18,9±3,2	33±2,4	45±2,5	11,2±1,5	7,6±0,6	16,3±3,1
Golgis	Surface	159	154	279	222,6	165	114
	Activité	38	105	240	105	39	56
	AS	24±3	68±7,75	86±4	47±1,7	23,6±0,8	49±7,5
Cytopl. périgo.	Surface	384	385	695	595		
	Activité	63	166	370	154		
	AS	16,4±2,5	43±4,6	53±4	26±2		

L'analyse cinétique globale des courbes de variation de l'AS dans l'ensemble (des sections) de chacun des 3 compartiments, en fonction du temps, peut être faite à partir de la représentation du graphique VII.

G R A P H I Q U E V I I

Variations de l'activité liée au fucose-^{3}H, en fonction du temps d'incorporation et en fonction du temps de chasse (coordonnées



Commentaire du graphique VII. L'extrapolation, à l'origine des ordonnées, des courbes d'apparition du traceur montre que l'incorporation s'effectue dans le cytoplasme (courbe C) dès la première minute de l'expérience. L'activité apparaît dans le noyau au cours de la 2e minute (courbe N), soit par transfucosylations in situ, soit par transfert précoce de précurseurs cytoplasmiques. L'incorporation la plus tardive (4e minute) a lieu dans la "sphère golgienne", c'est à dire dans un compartiment qui comprend les sections de dictyosomes (courbe Gi) et une mince pellicule cytoplasmique périgolgienne d'environ 1/2µ d'épaisseur (courbe Cgi).

D'autre part, on voit que les différentes courbes tendent plus ou moins rapidement vers des valeurs d'équilibre, caractéristiques de chaque compartiment. Cette interprétation graphique est confirmée par des données nouvelles qui montrent qu'après la 30e minute de la culture continue en présence de traceur, les AS des différents espaces cellulaires sont du même ordre de grandeur que celles mesurées à la 17e minute d'incorporation (travaux en cours ; Pl. VIII, fig. 17). On sait que l'allure de ces courbes d'approvisionnement, qui tendent plus ou moins rapidement vers des valeurs maximales, permet l'exploitation mathématique des données et le calcul des taux correspondants. Ces taux ont été estimés à $12\%.mn^{-1}$, 8 à $10\%.mn^{-1}$ et $20\%.mn^{-1}$ dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique et dans la "sphère golgienne" respectivement. On notera avec intérêt que les courbes C et Cgi tendent à des vitesses différentes vers la même valeur d'équilibre, caractéristique du "compartiment cytoplasme". Les espaces "cytoplasme périgolgien" et"cytoplasme périphérique" diffèrent donc par l'intensité des processus métaboliques qui s'y déroulent.

Bien que l'étude des processus de renouvellement soit malaisée (pour des raisons sur lesquelles nous ne pouvons nous étendre), l'allure des courbes est, au moins en première approximation, en accord avec ces estimations, exception faite des ensembles de dictyosomes et de cytoplasme périgolgien au niveau desquels le taux de renouvellement est plus faible que celui d'approvisionnement: le taux de disparition de l'activité dans la sphère golgienne a la même valeur que celui mesuré dans le cytoplasme périphérique, soit 8 à $10\%.mn^{-1}$.

L'examen du graphique VII nous conduit à conclure que la plus grande partie de la radioactivité est soumise à un turnover régulier et que seul subsiste, à la 60e minute de l'expérience,

un marquage résiduel correspondant au renouvellement lent des structures stables (voir résultats morphologiques).

Après 3 heures de culture, la représentation graphique montre que l'AS des sections de dictyosomes prend une valeur importante (⟶), du fait de la réutilisation, par les appareils de Golgi des cellules épithéliales, de macromolécules préalablement marquées dans les cellules germinales (Pl. IX, fig. 32).

Enfin, du point de vue des bilans quantitatifs et des transferts, il est intéressant de souligner que l'exploitation des données graphiques conduit aux résultats suivants :

- la quantité de radioactivité soumise à un renouvellement rapide dans les seules sections de dictyosomes ne représente que 3% de l'activité cytoplasmique.

- si nous considérons la radioactivité liée au fucose mis en place dans la "sphère golgienne" (saccules et cytoplasme périgolgien) nous trouvons qu'elle représente 7% de l'activité totale mesurée dans le cytoplasme périphérique.

4.) En conclusion , l'emploi du fucose-^{3}H permet de confirmer l'existence d'une synthèse glycoprotéique dans les épithéliums germinatifs. Les observations morphologiques et les résultats quantitatifs et cinétiques montrent que le traceur est presque exclusivement incorporé dans des complexes glycoprotéiques à turnover rapide parmi lesquels figurent des substances excrétées (marquage fugace des boursouflures et de la membrane plasmique).

Sur le plan topochimique, nos expériences mettent en évidence des faits qui ne sont pas entièrement en accord avec les données habituelles de l'autoradiographie de haute résolution. Nous les discuterons en présentant un schéma récapitulatif de la synthèse glycoprotéique dans le matériel embryonnaire que nous avons étudié.

III. - SYNTHESE GLYCOPROTEIQUE dans les EPITHELIUMS GERMINATIFS - CONCLUSION GENERALE.

Les données morphologiques et cinétiques fournies par l'autoradiographie ultrastructurale, confrontées à celles de la biochimie, peuvent conduire à la reconstitution dynamique des évènements topochimiques intra-cellulaires. Nous nous proposons d'examiner l'ensemble de nos résultats dans cette optique. Nous accorderons une attention particulière aux processus métaboliques qui se déroulent dans la sphère golgienne en raison de l'importance généralement attribuée aux appareils de Golgi dans la biosynthèse glycoprotéique, d'après les résultats autoradiographiques obtenus sur d'autres matériels.

1.) Séquences cinétiques et précurseurs. Nous résumons par la représentation graphique VIII,a les évènements cinétiques qui se produisent dans la sphère golgienne. Nous avons vu que l'approvisionnement en chaînes polypeptidiques préalablement synthétisées au niveau des ribosomes se fait au taux de $66\%.mn^{-1}$. Ce même taux mesure l'intensité d'approvisionnement du compartiment golgien en galactose. Nous avons interprété ce résultat en admettant que l'approvisionnement en complexes protéiques néosynthétisés agit comme facteur limitant de l'incorporation du galactose dans l'ensemble des appareils de Golgi (cf. graphique VI).

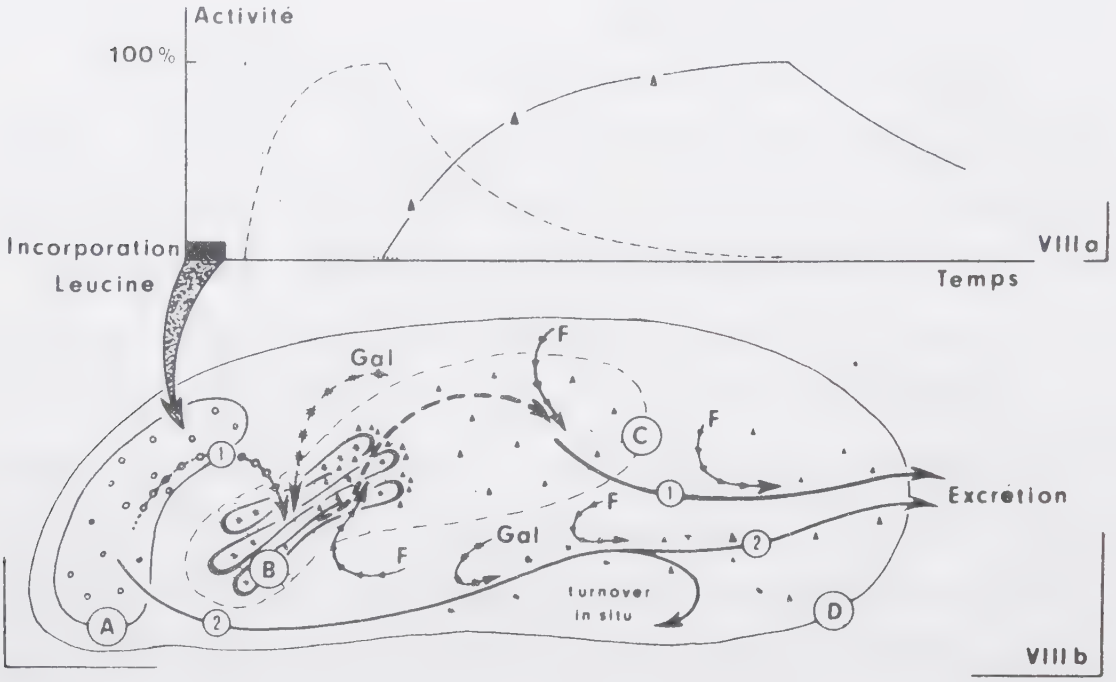
Les protéines intragolgiennes galactosylées sont renouvelées au taux de $20\%.mn^{-1}$ par l'effet d'un mécanisme biologique discontinu dont la description ne peut entrer dans le cadre de ce travail (R. DUBOIS, 25, 26). En bref, la courbe en trait interrompu du graphique VIII,a sera regardée comme traduisant schématiquement la dynamique du flux glycoprotéique durant l'épisode intragolgien au cours duquel se produisent les processus de galactosylation. Comparativement aux données obtenues avec la leucine-^3H et le galactose-^3H,

il est intéressant de constater que le fucose est incorporé au niveau de la sphère golgienne selon un taux de $20\%.mn^{-1}$, et non de $66\%.mn^{-1}$. Cette observation revêt un grand intérêt si on se rappelle que, d'un point de vue strictement morphologique, le pattern de distribution des grains qui révèle les sites d'incorporation du fucose diffère de celui qui met en évidence la mise en place du galactose dans les saccules golgiens : les activités galactosyltransférases seraient plutôt intra-golgiennes, tandis que les transfucosylations se produiraient plutôt dans l'environnement immédiat des sections de dictyosomes. Or, le taux d'incorporation du fucose-^3H (intensité d'accrochage du traceur) est égal au taux de sortie des produits intragolgiens galactosylés (voir graphique VIIIa et son explication). En d'autres termes, nous pouvons interpréter ce résultat en admettant que c'est précisément l'intensité du flux de sortie des complexes protéiques galactosylés qui détermine l'intensité d'accrochage du fucose au -niveau du cytoplasme intersacculaire et périgolgien (courbe en trait plein).

Nos expériences permettent de reconstituer, à l'échelle de l'organe, une séquence cinétique qui marque différentes étapes de la biosynthèse glycoprotéique, au niveau de la sphère golgienne. Il est remarquable que cette séquence cinétique, établie à partir de données acquises indépendamment les unes des autres, est en accord avec les acquisitions récentes de la biochimie : d'après les analyses biochimiques, la galactose occupe dans les chaînes carbohydrates accrochées au squelette polypeptidique, une position médiane, alors que le fucose est situé en position terminale (P. LOUISOT et R. GOT, 48).

G R A P H I Q U E V I I I

Schéma récapitulatif de la biosynthèse glycoprotéique dans les épithéliums germinatifs.



Explication du graphique VIII.

VIII,a : Séquences cinétiques globales.
La courbe descendante, en pointillé, figure l'intensité du renouvellement du pool des précurseurs protéiniques cytoplasmiques à destination golgienne (66% par mn : graphique IV).
La portion ascendante de la courbe en trait interrompu traduit la cinétique d'approvisionnement de l'ensemble des appareils de Golgi en polypeptides néosynthétisés (graphique IV) et en galactose (graphique VI).
La partie descendante de cette même courbe représente le renouvellement des produits intrasacculaires galactosylés (20% par mn ; graphique VI). Cette partie descendante peut être convertie en une courbe ascendante, en trait plein, qui lui est cinétiquement équivalente. On voit que les points (▲) qui correspondent à l'incorporation du fucose d'après les résultats expérimentaux s'inscrivent sur le profil de la courbe en trait plein.L'intensité d'incorporation de ce traceur est donc asservie au flux de sortie des produits intragolgiens galactosylés qui agit comme facteur limitant (voir texte). Les macromolécules cytoplasmiques marquées par les deux traceurs sont finalement renouvelées à un taux voisin de 10% par mn.

VIII,b : Interprétation en termes de topochimie cellulaire, à l'échelle locale.
La voie métabolique 1 reconstitue, à partir des résultats morphologiques et cinétiques obtenus dans l'ensemble de l'organe embryon-

naire , les étapes successives de la maturation des complexes glycoprotéiques qui transitent par l'appareil de Golgi (graphique VIII,a), dans une cellule donnée de l'ébauche épithéliale.
La voie métabolique 2 rappelle l'existence d'une synthèse glycoprotéique essentiellement cytoplasmique, indépendante de la voie golgienne (cf. texte).
Il est très important de noter que les taux qui mesurent les intensités des flux métaboliques globaux (bilans cinétiques du graphique VIII,a) ne sont en aucune façon extrapolables à la représentation VIII,b même comme taux "moyens". Cette représentation est strictement une interprétation d'ordre qualitatif (topochimie descriptive) à l'échelle d'une unité cellulaire et n'apporte aucun renseignement sur les intensités des flux métaboliques locaux. Du fait de l'aspect discontinu des évènements individuels, la notion de "taux moyen" est dépourvue de toute signification au niveau local. (R. DUBOIS, 26).

A = ergastoplasme granulaire et polysomes.
B = saccules golgiens.
C = cytoplasme inter-sacculaire et périgolgien.
D = "phase cytoplasmique non particulaire".

o = sites de synthèse polypeptidique.
✸ = sites de galactosylations.
▲ = sites de fucosylations.

2.) Données cinétiques globales et topochimie cellulaire.

Nous avons attiré l'attention sur le fait que les descriptions cinétiques globales du type continu ne sont valables qu'à l'échelle de l'organe considéré dans son ensemble, et ne sont pas extrapolables à l'échelle locale, au niveau de chaque unité fonctionnelle qui travaille de façon discontinue et rythmique (cf. Page 10).

Nos résultats cinétiques ont cependant une signification d'ordre qualitatif, dans le domaine de la biochimie cellulaire, quand on les traduit dans un contexte topochimique (Schéma VIIIb). En effet, l'analyse dynamique et statistique du comportement des dictyosomes considérés individuellement, c'est à dire des évènements, locaux, montre que la cinétique de renouvellement des produits intragolgiens décrit, en réalité, les modalités d'expulsions rapides et relativement spontanées qui se produisent au hasard dans une population golgienne travaillant de façon cyclique et asynchrone

(R. DUBOIS, 26).

Les correspondances cinétiques indiquent donc que le fucose est mis en place dans les complexes glycoprotéiques en voie d'achèvement au moment de leur expulsion brutale hors des dictyosomes fonctionnels. Elles ne nous apprennent rien sur l'intensité des flux locaux, mais elles nous renseignent par contre sur les sites intracellulaires au niveau desquels les processus biochimiques se produisent. On voit ainsi que c'est dans un contexte strictement qualitatif, c'est à dire topochimique, qu'il convient de lire le schéma VIIIb. Ce schéma montre que, dans la sphère golgienne de chaque cellule, les sites de galactosylation des glycoprotéines sont intra-sacculaires et topographiquement distincts des sites de fucosylation. Le fucose-^{3}H est mis en place dans les complexes glycoprotéiques galactosylés expulsés hors des dictyosomes métaboliquement actifs et les activités fucosyl-transférases "golgiennes" sont préférentiellement concentrées à l'extérieur du système endomembranaire des saccules.

Dans un travail récent sur les cellules épithéliales de la vessie de Grenouille M. PISAM et P. RIPOCHE (60) confirment cette conclusion en décrivant l'incorporation du fucose-^{3}H en dehors des dictyosomes, dans la zone du "GERL" de NOVIKOFF. Nous verrons qu'il en est strictement de même pour les fucosylations qui s'effectuent dans la sphère golgienne des cellules germinales du Poulet (3e Partie).

3.) Importance relative du compartiment golgien dans la synthèse glycoprotéique.

Nous avons rappelé qu'un certain nombre de travaux d'ordre autoradiographique tendent à montrer que les activités galactosyl-transférases et fucosyl-transférases sont exclusivement localisées dans les

seuls appareils de Golgi. Cette hypothèse implique que toute biosynthèse glycoprotéique utilisant le galactose et le fucose comme précurseurs comporte nécessairement une étape intragolgienne. De fait, les appareils de Golgi des cellules synthétisant les glycoprotéines sont le lieu d'une intense réaction autoradiographique. Mais nous avons insisté sur l'insuffisance des preuves qui, dans ce genre de question, s'appuient exclusivement sur les localisations et les "migrations" des grains d'argent, et sur les déplacements des pics de radioactivité. Il est indispensable de contrôler si les données chronologiques, quantitatives et cinétiques sont en accord avec l'hypothèse d'une voie unique de drainage des glycoprotéines par les appareils de Golgi. Or, dans notre matériel d'étude, nous constatons les faits suivants :

- l'emploi de leucine-^{3}H montre que la fraction des protéines néosynthétisées qui transitent par les dictyosomes est très faible, de l'ordre de 2% des protéines cytoplasmiques totales. Mais il n'est pas surprenant que de nombreuses protéines ne comportent pas d'épisode golgien au cours de leur vie intracellulaire.

- toutefois, l'emploi de galactose-^{3}H nous montre une situation semblable : la radioactivité incorporée dans l'espace golgien ne représente qu'environ 12% de la radioactivité cytoplasmique. De plus, la radioactivité cytoplasmique apparaît plus précocement que le marquage des dictyosomes et ne peut provenir du transfert de précurseurs intragolgiens. Il était donc permis d'envisager l'hypothèse d'une incorporation de galactose sur les complexes glycoprotéiques dans l'espace cytoplasmique. En raison de l'instabilité biochimique du galactose, un doute subsistait cependant, l'image autoradiographique

cytoplasmique pouvant être attribuée à l'incorporation d'un dérivé métabolique du traceur.

- la stabilité biochimique du L-Fucose et sa spécificité d'incorporation dans les glycoprotéines lèvent cette dernière incertitude. En effet, l'emploi du fucose-^{3}H montre que la réaction autoradiographique la plus précoce apparaît dans le cytoplasme. Au niveau de la sphère golgienne elle-même, la mise en place du fucose dans les chaînes carbohydrates se fait, pour une grande part, dans la phase cytoplasmique. Et il est exclu, pour des raisons d'ordre quantitatif, que l'intensité des fucosylations qui se produisent dans la sphère golgienne suffise à rendre compte des évènements métaboliques qui se déroulent dans le cytoplasme périphérique. Les glycoprotéines d'origine golgienne marquées par le fucose tritié ne représentent que 7% de la radioactivité cytoplasmique dans nos conditions expérimentales.

4.) Conclusion.

L'emploi de précurseurs appropriés a permis de dégager les preuves d'une biosynthèse glycoprotéique dans les cellules épithéliales des ébauches gonadiques du Poulet.

La grande majorité de ces substances sont soumises à un renouvellement rapide par une activité excrétrice de type holo-mérocrine. Les conditions expérimentales qui ont été adoptées montrent donc l'existence d'une fonction sécrétrice et excrétrice de ces organes embryonnaires, tout en précisant la nature biochimique des produits expulsés.

Nos résultats apportent d'autre part des renseignements intéressants, du point de vue qualitatif, sur la topochimie intracellulaire de la biosynthèse glycoprotéique. Il est confirmé que les appareils de Golgi jouent un rôle dans les processus de glycosylation des produits glycoprotéiques. Les activités enzymatiques qui gouvernent l'accrochage

du galactose sont topographiquement séparées de celles qui président au couplage du fucose, les activités fucosyl-transférases ayant préférentiellement une localisation extra-sacculaire.

Bien que la sphère golgienne représente un site d'intense glycosylation des complexes glycoprotéiques, son rôle demeure quantitativement limité.

Du point de vue des transferts et des bilans quantitatifs, l'hypothèse selon laquelle les glycoprotéines galactosylées et fucosylées auraient leur origine dans les seuls appareils de Golgi n'est pas vérifiée. Le compartiment golgien n'est donc pas un site exclusif d'achèvement des glycoprotéines et il est nécessaire d'admettre l'existence d'une autre voie de biosynthèse glycoprotéique essentiellement cytoplasmique, indépendante de l'itinéraire golgien et quantitativement importante (court-circuitage des appareils de Golgi ; schéma VIIIb, voie métabolique 2 ; cf. J.D. JAMIESON et G.E. PALADE, 44 ; D.J. MORRE et all., 54 ; G. PELLETIER et R. PUVIANI, 59).

TROISIEME PARTIE

ROLE des GLYCOPROTEINES dans le MECANISME de MIGRATION CHIMIOTACTIQUE des CELLULES GERMINALES

Le concept de chimiotactisme implique des propriétés amiboïdes pour les cellules germinales migratrices et une sensibilité élective de leur surface membranaire à certains messagers chimiques émis par les épithéliums germinatifs attractifs.

I. - L'AMIBOIDISME des CELLULES GERMINALES PRIMORDIALES - OBSERVATIONS ULTRASTRUCTURALES et HISTOCHIMIQUES.

1.) Aspects morphologiques. Les cellules germinales pénètrent activement dans les épithéliums germinatifs attractifs. L'activité migratrice des CGP se manifeste par la formation de pseudopodes parfois considérablement développés (Pl. X, fig. 1, 2 et 3). Certains pseudopodes donnent naissance à des prolongements cytoplasmiques longs et grêles, sortes de "tentacules" qui plongent dans l'épithélium germinatif (Pl. X, fig. 2).

La pénétration des CGP s'accompagne d'une intense activité pinocytique et phagocytique. Il est fréquent de rencontrer dans le cytoplasme des formations pseudopodiales de nombreux corps denses de la lignée lysosomiale (Pl. X, fig. 2).

Nous n'avons pu identifier, dans les conditions de préparation de nos échantillons, aucun élément structural pouvant rendre compte des propriétés amiboïdes des CGP : microtubules ou microfilaments contractiles. Il ne semble donc pas que l'amiboïdisme des CGP résulte des propriétés contractiles d'éléments intracytoplasmiques figurés, visibles à l'ultramicroscope. Dans cet ordre

P L A N C H E X

Aspects ultrastructural et histochimique des C.G.P.

Figures 1 et 2 : Cellule germinale s'installant dans l'épithélium germinatif attractif. Noyau volumineux et clair, à nucléoles réticulés, liposomes (L) dans le cytoplasme. Remarquer la formation "tentaculaire" grêle (T) qui prolonge un pseudopode (fig. 2). Noter la grande richesse du pseudopode en corps denses (CD) de la lignée lysosomiale. Cf. fig. 15 et 21, Pl. XII et fig. 38, Pl. XIV.(x 3750 et x 11 500).

Figure 3 : Cellule germinale primordiale en migration à proximité de l'épithélium germinatif. Remarquer les nombreux pseudopodes. (x 3300).

Figure 4 : Détail d'une cellule germinale s'installant dans l'épithélium germinatif. Noter la richesse du cytoplasme en liposomes (L) et en glycogène (Gly) et la forte concentration de glycogène dans les prolongements pseudopodiaux (Ps). (x 9000).

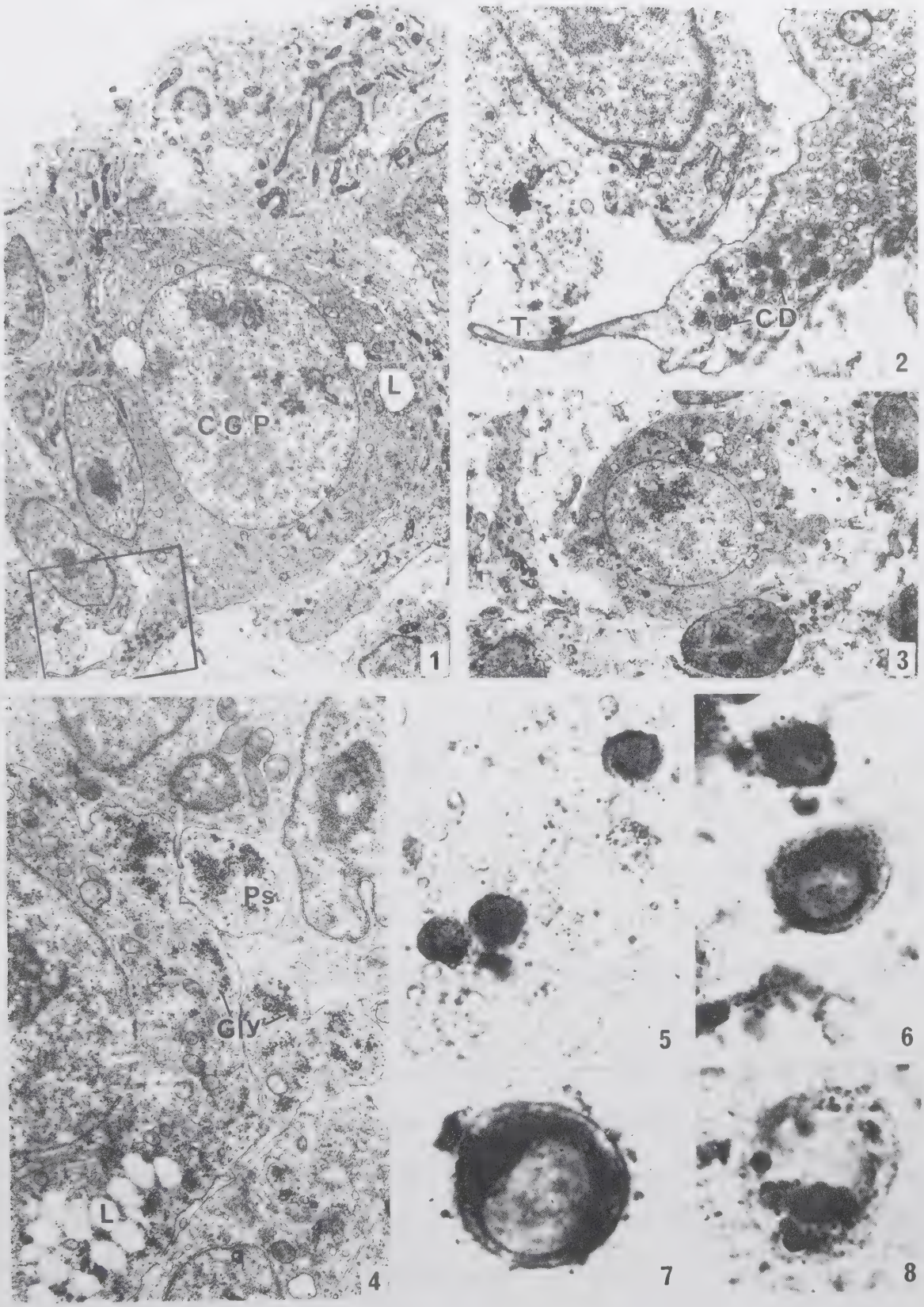
Figure 5 : Mise en évidence d'une intense activité estérasique dans les cellules germinales. La coloration azoïque marque électivement les cellules germinales dans un temps d'incubation qui ne permet pas de révéler l'activité estérasique des cellules somatiques. (x environ 650).

Figures 6 et 7 : Activité estérasique dans les CGP.

L'activité enzymatique est particulièrement intense au niveau de globules cytoplasmiques qui correspondent vraisemblablement aux gouttelettes de lipides figurés (fig. 6 et 7). L'ensemble du cytoplasme montre une coloration azoïque plus discrète (fig. 7) (x environ 1200 et environ 1800).

Figure 8 : Activité estérasique en présence d'ésérine 10^{-5}M.

La réaction persiste au niveau des globules cytoplasmiques ; elle est très atténuée au niveau du cytoplasme par inhibition des estérases ésérino-sensibles. Comparer à la figure 7. (x environ 1800).


L
C G P
1
T
C D
2
3
Ps
Gly
L
4
5
6
7
8

d'idée, il est intéressant de signaler que la cytochalazine B, inhibiteur de la motilité cellulaire, employée à des concentrations qui entraînent la destruction des structures filamenteuses contractiles (coeur embryonnaire, cellules épithéliales....etc.) n'inhibe pas la migration des CGP (voir plus loin). Le cytoplasme des CGP est riche en glycogène et en gouttelettes lipidiques (Pl. X, fig. 4). On remarque que d'importantes concentrations de glycogène sont localisées dans les pseudopodes. Les techniques histochimiques confirment ces observations, en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs (B. MINTZ, 52 ; D.B. MEYER et R.O'RAHILLY, 51 ; R.C. CLAWSON et L.V. DOMM, 12 ; D.B. MEYER, 50). Nous avons également mis en évidence, par la technique de J.T.Y. CHOU (11), les nombreuses enclaves lipidiques intracytoplasmiques (R. DUBOIS et D. CUMINGE, 28). Le glycogène et les liposomes constituent vraisemblablement des réserves énergétiques nécessaires aux déplacements amiboïdes des CGP. CLAWSON et DOMM ont souligné le fait que la réserve glycogènique diminue au cours de la migration des CGP. Nous confirmons cette conclusion et nous observons concomitamment une diminution des lipides figurés.

2.) Mise en évidence d'activités estérasiques dans les cellules germinales.

a-/ Techniques : La recherche des estérases est effectuée sur les tissus vivants. L'épithélium germinatif du 3e jour de l'incubation et les fines tranches de gonade morphologiquement indifférenciée (5e jour de l'incubation) sont introduits dans le milieu liquide suivant :

- 25 mg de β naphtyl acétate dans 0,5 ml d'acétone.
- 150 ml de solution de tampon Tris (pH 8,5 ; 0,05 M) contenant sucrose (0,44 M) et NaCl (8 ‰).
- 50 mg de sel de diazonium (Diazo Blue B), ajoutés extemporanément.

Les tissus frais sont soumis à une agitation continue dans ce milieu d'incubation durant 10 minutes à 38° C. Les observations sont faites au microscope optique dans ce même milieu, entre lame et lamelle, après dilacération et léger écrasement des tissus.

b-/ Résultats : Les cellules germinales des épithéliums germinatifs et les gonocytes de la jeune gonade indifférenciée montrent une intense activité estérasique. La coloration azoïque apparaît dans tout le cytoplasme, mais elle est plus particulièrement marquée au niveau des gouttelettes lipidiques (Pl. X, fig. 5, 6 et 7).

Une partie de l'activité estérasique cytoplasmique diffuse est inhibée par l'ésérine à la concentration de 10^{-5}M. Par contre, en présence d'ésérine, la réaction persiste dans les gouttelettes lipidiques (Pl. X, fig. 8).

c-/ Conclusion. D'après ces résultats préliminaires nous pouvons conclure que les cellules germinales primordiales et les gonocytes primaires montrent une forte concentration en estérases carboxyliques, vraisemblablement liées aux processus de dégradation et d'utilisation des réserves lipidiques. L'existence d'une activité choline-estérasique doit également être envisagée. Cependant des récherches ultérieures seront nécessaires pour confirmer le rôle important que pourrait jouer cet équipement enzymatique dans le métabolisme des CGP en migration ; le fait que le parathion inhibiteur d'estérases d'après B.W. WILSON et all., 78, provoque

la stérilisation des embryons d'Oiseau (Y. LUTZ-OSTERTAG et all, 49), est en faveur de la validité de cette hypothèse.

II. - BIOSYNTHESE GLYCOPROTEIQUE et ACTIVITE MEMBRANAIRE dans les CELLULES GERMINALES.

L'étude de la biosynthèse glycoprotéique dans les épithéliums germinatifs fournit des résultats au niveau des cellules germinales, et nous avons constaté que ces dernières incorporent intensément le galactose-^{3}H et le fucose-^{3}H.

Nous nous proposons d'étudier les modalités d'incorporation de ces deux précurseurs et de suivre la destinée des complexes glycoprotéiques élaborés par les cellules germinales, en utilisant le matériel expérimental qui a servi à nos précédentes descriptions (2e Partie). En ce qui concerne le galactose-^{3}H, nous prendrons en considération la série expérimentale GAL 4 (1250 µCi/ml pendant 15 minutes, puis chasse ; cf. page 54). Pour le fucose-^{3}H, nous rappelons que le précurseur est employé à la concentration de 1250 µCi/ml. Nous nous bornerons à l'aspect morphologique des observations.

1.) Etude morphologique dynamique des données autoradiographiques obtenues avec le galactose-^{3}H.

Après 15 minutes d'incorporation, la réaction autoradiographique apparaît préférentiellement localisée sur les structures dictyosomales et dans l'environnement immédiat des appareils de Golgi (Pl. XI, fig. 9). Toutefois une fraction non négligeable de la radioactivité est retrouvée dans le cytoplasme et dans les noyaux.

Au niveau de l'appareil de Golgi les grains qui révèlent les macromolécules ayant incorporé le traceur, recouvrent les structures membranaires des saccules et des vésicules (Pl. XI, fig. 10). On peut déduire de cette observation que, dans la sphère golgienne,

P L A N C H E X I

Localisation de la radioactivité liée au galactose-^{3}H après incorporation par les cellules germinales.

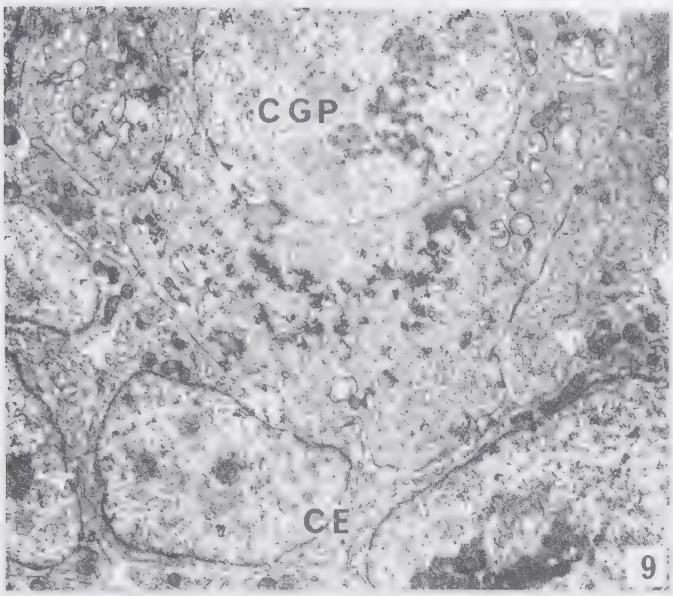
Figure 9 : Incorporation de 15 minutes. Intense réaction autoradiographique dans l'appareil de Golgi. Marquage discret dans les espaces nucléaire et cytoplasmique. La membrane plasmique et les pseudopodes ne sont pas radioactifs à ce temps. CE = cellule épithéliale. (x 6200).

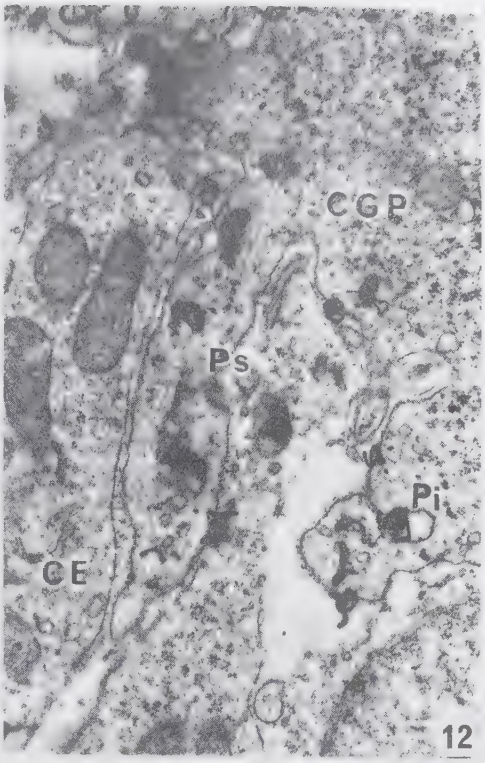
Figure 10 : Détail de la précédente. Les grains d'argent sont principalement concentrés sur les structures membranaires des appareils de Golgi (saccules et vésicules). Intense réaction aux extrémités de certains arcs sacculaires et densité granulaire plus faible dans le cytoplasme intra- et périgolgien. (x 16 000).

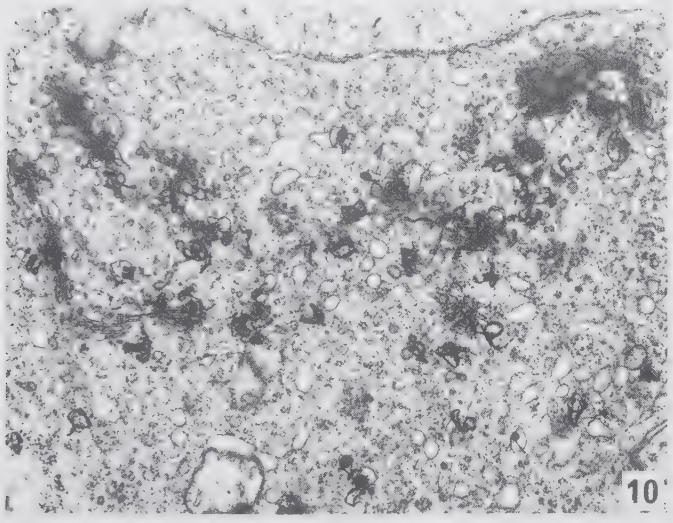
Figure 11 : Après 15 minutes de chasse, la réaction autoradiographique demeure intense dans la zone golgienne. Net démarquage des structures sacculaires et concentration des grains d'argent dans la région "interne" des dictyosomes. Voir également fig. 27, Pl. XIII. (x 20 000).

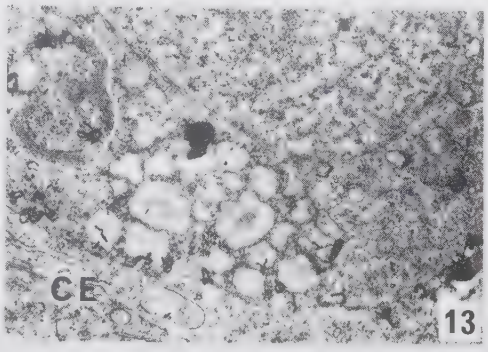
Figure 12 : 15 minutes de chasse. Marquage intense du cytoplasme axial d'un pseudopode et de la membrane plasmique au niveau des processus de pinocytose (Pi). On notera que ce marquage périphérique apparaît précocement au cours de l'expérience de chasse et qu'il est contemporain du marquage des appareils de Golgi. (x 20 000).

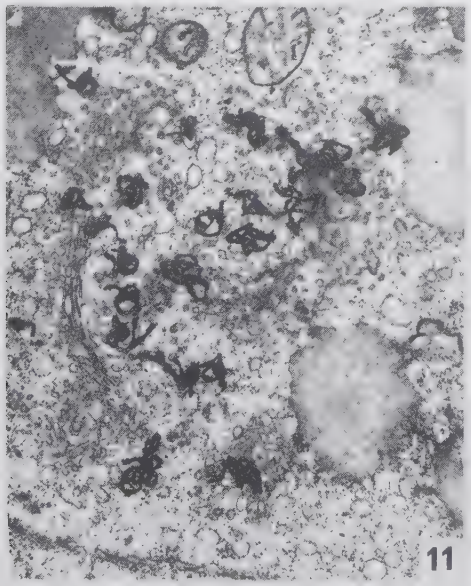
Figures 13 et 14 : Après 45 minutes de chasse, les appareils de Golgi ont généralement perdu leur radioactivité. Les grains d'argent, préférentiellement localisés sur la membrane plasmique soulignent le contour de la cellule germinale (fig. 13). La réaction autoradiographique est particulièrement intense au niveau des microvillosités (fig. 14) et des déformations de la membrane plasmique. (x 6200 et x 20 000).

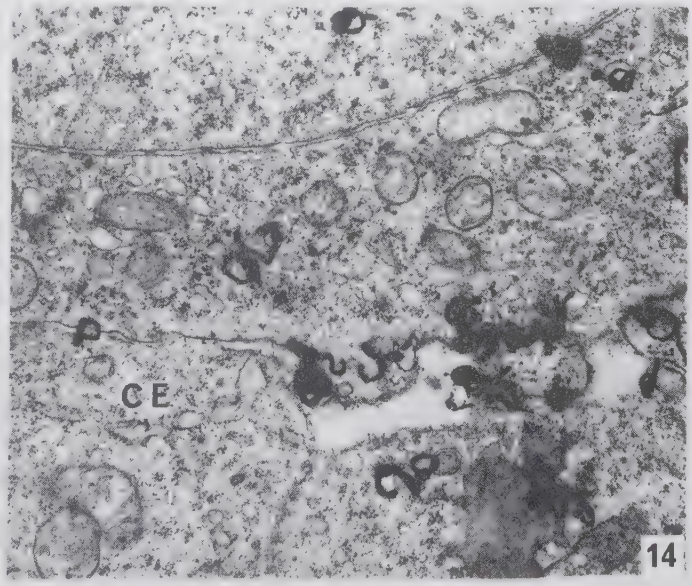

CGP
CE
9


CGP
Ps
Pi
CE
12


10


CE
13


11


CE
14

les enzymes responsables de l'accrochage du galactose sont localisées dans les formations sacculaires et vésiculaires des appareils de Golgi.

Au cours de l'expérience de chasse, la répartition des grains d'argent qui révèlent les macromolécules néosynthétisées subit des modifications très nettes. Ces transformations du pattern autoradiographique correspondent à des remaniements internes variés ("déplacements" des grains) qui peuvent être en rapport avec les destinées diverses des macromolécules radioactives. Nous en ferons une description détaillée.

a-/ Appareils de Golgi. Les produits radioactifs séjournent quelque temps dans les appareils de Golgi, mais ce temps varie d'une cellule germinale à l'autre. Certains dictyosomes se démarquent précocement, d'autres tardivement. La figure 11 de la planche XI montre un appareil de Golgi fortement radioactif, après 15 minutes de chasse sur le milieu enrichi en précurseur froid. Les saccules golgiens se démarquent et les grains d'argent sont concentrés dans la zone "interne" du dictyosome (GERL de Novikoff, 58), traduisant la sortie des substances intragolgiennes néosynthétisées. Après un temps de chasse suffisamment long (30 à 45 minutes) la grande majorité des appareils de Golgi sont démarqués (Pl. XI, fig. 13).

b-/ Marquage de la membrane plasmique, des pseudopodes et des microvillosités. Aux temps initiaux de l'expérience de chasse, la membrane plasmique et le cytoplasme périphérique ne montrent généralement pas de fortes concentrations de grains d'argent. Certains pseudopodes apparaissent cependant radioactifs dès les 15 premières minutes de culture sur milieu froid.

Les grains sont intracytoplasmiques et marquent l'axe du pseudopode (Pl. XI, fig. 12). Une image autoradiographique relativement intense souligne les endroits au niveau desquels la membrane plasmique est tourmentée (micropseudopodes et processus de pinocytose).

A la 60e minute de l'expérience (45 minutes de chasse), les faits sont beaucoup plus tranchés et présentent un caractère de généralité. La perte de la radioactivité dans les appareils de Golgi s'accompagne de l'apparition de nombreux grains d'argent sur la membrane plasmique (Pl. XI, fig. 13). La radioactivité cytoplasmique à elle-même fortement décru. Il est donc vraisemblable qu'une fraction importante des produits intragolgiens et cytoplasmiques marqués par le galactose-^{3}H ont la membrane plasmique comme lieu de destination : le contour des CGP demeurera longtemps fortement radioactif dans un épithélium germinatif pratiquement démarqué.

Le marquage de la membrane plasmique des cellules germinales n'est pas uniformément réparti. Les grains d'argent sont principalement retrouvés dans le cytoplasme des pseudopodes, - ainsi que nous l'avons décrit plus haut -, et dans les microvillosités qui bourgeonnent à la surface des CGP. Ces microvillosités montrent fréquemment une accumulation de macromolécules radioactives rassemblées à leur apex et à leur base (Pl. XI, fig. 14). Nos conditions expérimentales ne permettent pas de décider si les pseudopodes et microvillosités sont les lieux de destination des substances marquées ou si, au contraire, c'est l'accumulation de ces substances dans certains sites périphériques qui induit la production de ces déformations de la membrane plasmique.

c-/ Marquage des corps denses et multivésiculaires.

Les corps denses (Pl. XII, fig. 15) et multivésiculaires (Pl. XII, fig. 16) représentent d'autres sites d'intense réactivité autora-

diographique lorsque le temps de chasse a été suffisamment long. L'origine golgienne de cette radioactivité est hautement probable puisque la lignée lyzosomiale prendrait naissance dans les appareils de Golgi (R. ROBINEAUX et all., 67). On sait d'autre part que ces organites cytoplasmiques sont riches en enzymes hydrolytiques diverses. La progression chimiotactique des CGP s'accompagne de processus de pinocytose et de phagocytose et il n'est pas surprenant que les fonctions hydrolytiques (endo- et exopeptidasiques par exemple) soient fortement stimulées dans ces cellules.

Il est intéressant, dans ce contexte, de présenter des images qui suggèrent l'existence d'exohydrolases. Nous savons qu'au niveau des microvillosités (Pl. XII, fig. 17), des pseudopodes (Pl. XII, fig. 18) et autres prolongements cytoplasmiques, la radioactivité est le plus souvent intracytoplasmique, marquant l'axe, la base et l'apex des protrusions cellulaires. Si nous comparons l'illustration 19 à ces deux images, nous constatons une nette différence dans la distribution des grains d'argent. Sur la figure 19, la réaction autoradiographique montre une tendance à souligner le contour externe du prolongement tentaculaire émis par la cellule germinale. Ne peut-il s'agir d'enzymes hydrolytiques qui prépareraient les voies de pénétration des CGP dans les épithéliums germinatifs et favoriseraient leur progression ? Rappelons enfin que la présence de nombreux corps denses à proximité des prolongements pseudopodiaux est fréquemment observée (Pl. X, fig. 2 ; D. CUMINGE et R. DUBOIS, 16, fig. 20).

Aux temps plus tardifs de l'expérience de chasse, les cellules germinales montrent d'importantes concentrations de grains d'argent dans certaines régions golgiennes, les corps multivésiculaires, le cytoplasme périphérique (Pl. XII, fig. 20, - 90e minute de l'expérience). Le plus souvent, les appareils de Golgi ne montrent plus

P L A N C H E X I I

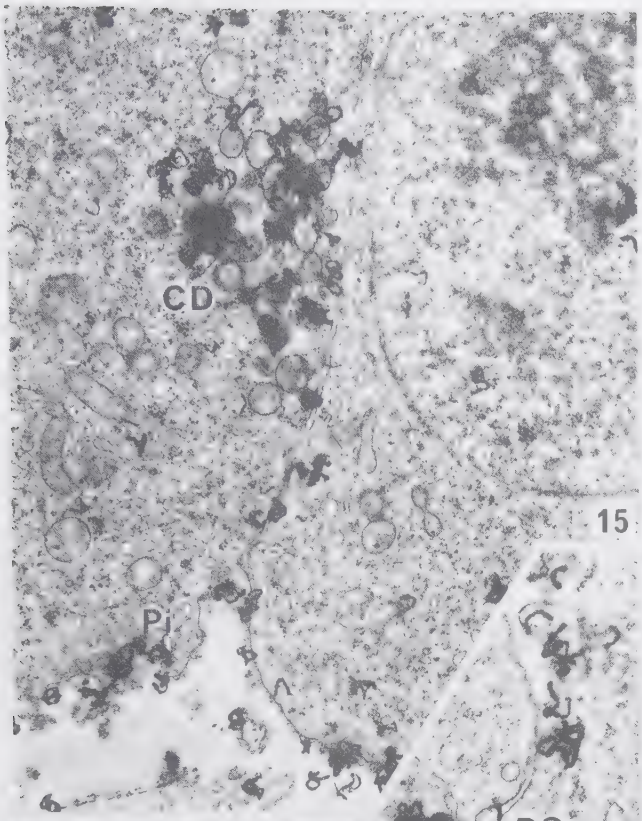
Incorporation de galactose-^{3}H par les cellules germinales (suite).

Figures 15 et 16 : 15 minutes d'incorporation suivies de 45 minutes de chasse. Marquage très intense des groupes de corps denses (fig. 15) et des corps multivésiculaires (fig. 16) d'origine vraisemblablement golgienne. On notera que le marquage de la lignée lysosomiale est consécutif à la perte de radioactivité au niveau des dictyosomes. Nombreux grains sur la membrane plasmique, notamment dans les régions où se déroulent les processus de pinocytose (fig. 15). (x 12 000 et x 20 000).

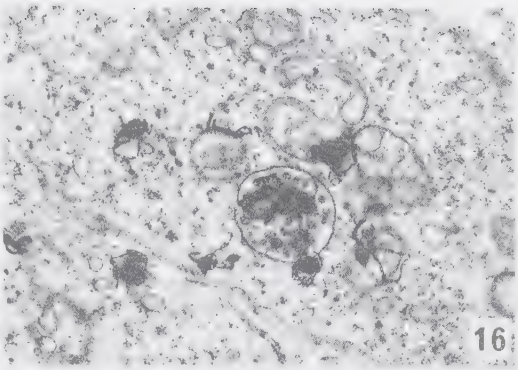
Figures 17, 18 et 19 : Même temps que précédemment. Sur les figures 17 et 18, les grains d'argent sont intracytoplasmiques, localisés à la base et à l'apex des microvillosités et dans l'axe des prolongements pseudopodiaux. Par contre, sur la figure 19, les grains ont tendance à souligner le contour externe du pseudopode : ce marquage peut être interprété comme traduisant l'existence d'exohydrolases qui préparent les voies de pénétration des CGP. VP = vésicule de pinocytose. (x 15 000, x 18 000 et 15 000, dans l'ordre).

Figure 20 : 90e minute de l'expérience. Quelques cellules germinales montrent encore, à ce temps tardif de l'expérience de chasse, une importante réaction autoradiographique dans les compartiments golgien et cytoplasmique. CM = corps multivésiculaire marqué. (x 20 000).

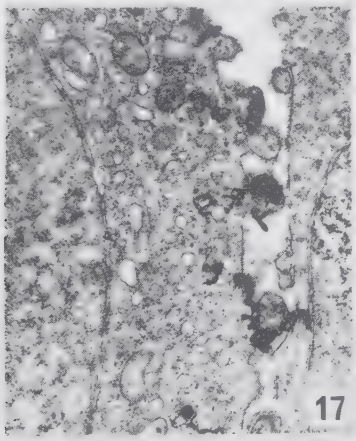
Figures 21 et 22 : Après deux heures d'expérience, la grande majorité des appareils de Golgi ne sont plus radioactifs. Le marquage persiste sur les groupes de corps denses (fig. 21) et il est très intense dans les zones de la membrane plasmique perturbées par les processus de pinocytose (fig. 22). Noter que les cellules épithéliales perdent la quasi totalité de leur radioactivité au cours de l'expérience de chasse (cf. fig. 13, 14, Pl. XI et fig. 19 et 22, Pl. XII, CE). (x 12 000 et x 20 000).



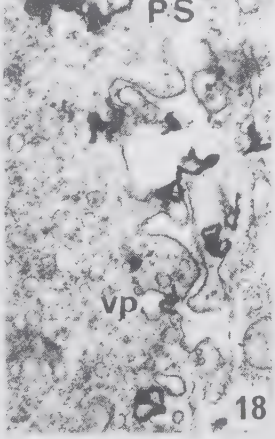
15



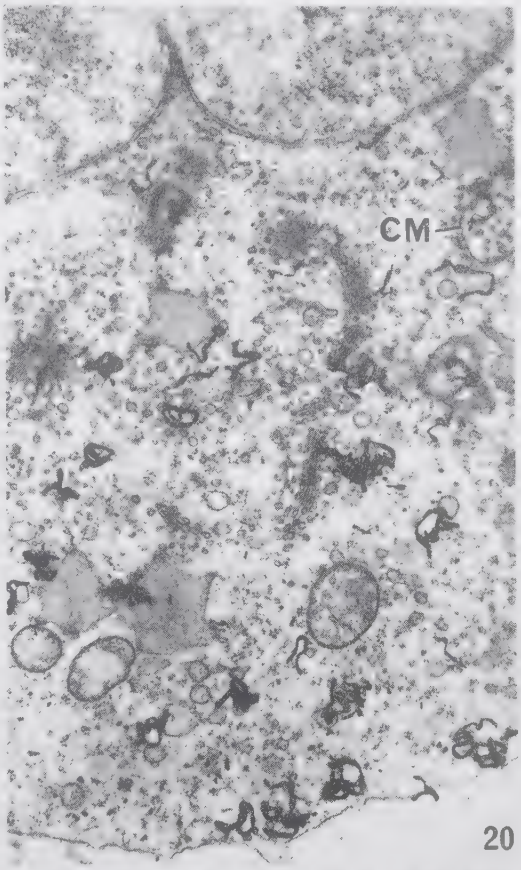
16



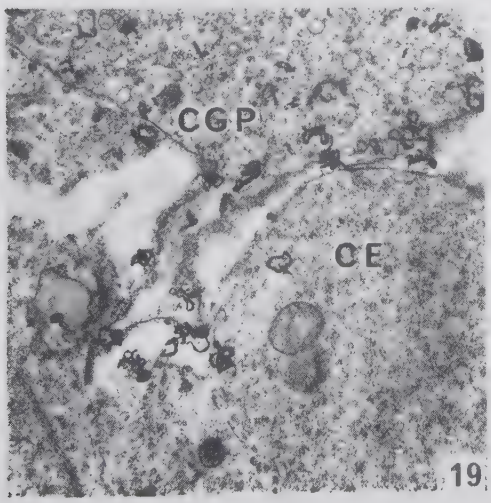
17



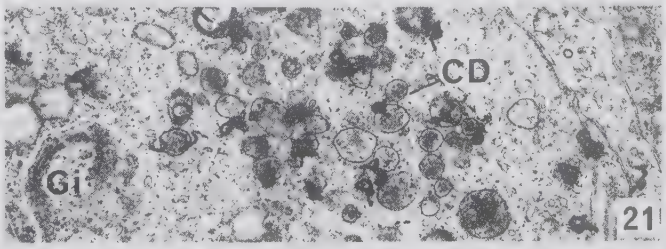
18



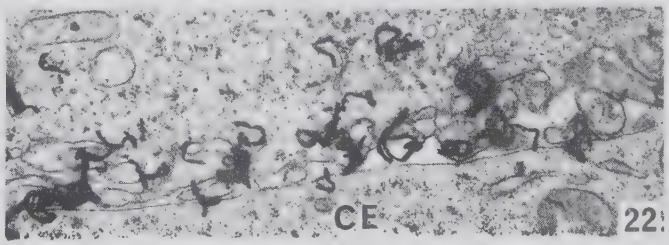
20



19



21



22

de radioactivité et l'image autoradiographique demeure intense au niveau des groupes de corps denses (Pl. XII, fig. 21). La membrane plasmique n'est généralement pas radioactive dans les régions dépourvues de microvillosités et autres déformations ; par contre, dans les régions où se déroulent des processus de pinocytose, la concentration en substances radioactives est remarquablement dense, ainsi que le montre la figure 22 qui correspond aux faits observés à la fin de la deuxième heure de l'expérience.

En conclusion, les observations faites sur les sections de cellules germinales après une incorporation de galactose-^{3}H pendant 15 minutes diffèrent, par plusieurs aspects, de celles qui ont été décrites à propos des cellules épithéliales :

- l'intensité des galactosylations est plus marquée dans les dictyosomes des cellules germinales, comparativement à ce qui se passe dans ceux des cellules épithéliales.

- d'autre part, l'expulsion des substances intragolgiennes galactosylées se produit préférentiellement dans la zone interne délimitée par la concavité des arcs sacculaires, et non dans tout le pourtour du cytoplasme périgolgien.

- mais surtout, le renouvellement des complexes galactosylés synthétisés dans les cellules germinales est beaucoup plus lent que le turnover des glycoprotéines dans la composante épithéliale. Le galactose-^{3}H révèle l'existence de voies métaboliques variées liées aux fonctions lytique (corps denses et hydrolases) et migratrice (activité membranaire) des cellules germinales, alors que ce même précurseur a permis de mettre en évidence la fonction essentiellement excrétrice des épithéliums germinatifs.

En l'absence de données numériques et statistiques suffisamment nombreuses (les sections de cellules germinales sont beaucoup plus rares que les sections de cellules épithéliales), il n'est pas possible de tirer des conclusions définitives sur l'origine et les voies de migration intracellulaires des différentes substances marquées par le galactose-^{3}H. Toutefois, nos descriptions démontrent le rôle important joué par les appareils de Golgi dans les galactosylations de macromolécules vraisemblablement glycoprotéiques et permettent d'établir que ces produits galactosylés ont des rapports spécifiques avec l'activité membranaire des cellules germinales, c'est à dire avec les mécanismes de migration chimiotactique.

2.) Etude morphologique dynamique des données autoradiographiques obtenues avec le fucose-^{3}H.

L'emploi du galactose-^{3}H suggère fortement que les cellules germinales synthétisent des substances de nature glycoprotéique destinées, pour une grande part, à la lignée lysosomiale et à la membrane plasmique. Pour des raisons de spécificité biochimique déjà précisées, l'hypothèse d'une synthèse glycoprotéique dans les cellules germinales peut être vérifiée en mettant en oeuvre le fucose-^{3}H.

a-/ Observations au niveau de la sphère golgienne, (Pl. XIII). Au cours des 5 premières minutes de culture sur le milieu radioactif, les sections de dictyosomes ne se marquent généralement pas (Pl. XIII, fig. 23). Après 10 minutes d'incorporation, la réaction autoradiographique apparaît au niveau des sections d'appareils de Golgi, mais elle demeure discrète malgré la forte concentration (1250 µCi/ml) du milieu d'incubation en traceur (Pl. XIII, fig. 24). On remarque qu'à ces temps initiaux, les illustra-

tions révèlent une densité granulaire faible dans le cytoplasme et plus marquée dans les noyaux.

Il est nécessaire d'attendre un plus long temps d'incorporation pour observer une intense réaction autoradiographique dans les appareils de Golgi. Les figures 25 et 26 correspondent à une culture continue de 20 minutes en présence du fucose-^{3}H. Nous voyons que la concentration en grains d'argent est importante dans l'environnement des structures sacculaires. L'illustration 26, qui représente une figure classique de section d'un dictyosome de cellule germinale, est instructive comparativement à l'image suivante (Pl. XIII, fig. 27) : la figure 26 correspond à une incorporation continue de fucose-^{3}H pendant 20 minutes, alors que la figure 27 représente la réaction autoradiographique obtenue après une incorporation de galactose-^{3}H (15 minutes) suivie d'une chasse de 15 minutes. Ainsi, dans les cellules germinales, les glycoprotéines qui transitent par les appareils de Golgi sont fucosylées après qu'elles ont été expulsées des structures sacculaires, notamment dans la région du "GERL de Novikoff". On remarque d'autre part que la densité granulaire consécutive à une incorporation de 20 minutes de fucose-^{3}H demeure plus faible que celle obtenue après un approvisionnement en galactose-^{3}H durant 15 minutes. Il est nécessaire de prolonger le contact avec le fucose tritié pour observer une forte concentration de macromolécules radioactives dans les zones golgiennes, ainsi que le montre la figure 28 qui a été obtenue après une culture continue de 30 minutes sur le milieu radioactif.

Bien que l'absence d'arguments d'ordre quantitatif nous contraigne à des conclusions nuancées, il semble que l'intensité des fucosylations est relativement moindre que celle des galacto-

P L A N C H E X I I I

Localisation de la radioactivité liée au fucose-^{3}H après incorporation par les cellules germinales (appareils de Golgi).

Figure 23 : 5 minutes d'incorporation. Discrète réaction autoradiographique au niveau des sections de dictyosomes. Incorporation du traceur dans certaines mitochondries. (x 15 000).

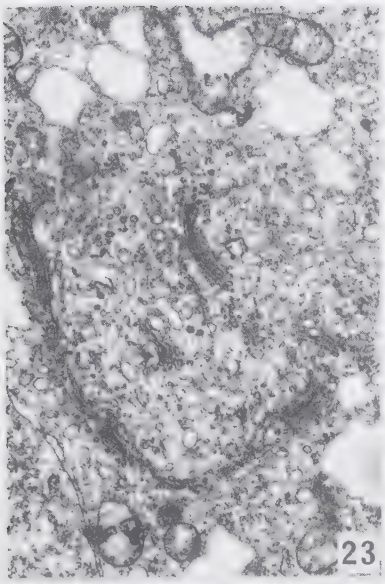
Figure 24 : 10 minutes d'incorporation. La densité granulaire demeure faible malgré l'importante concentration du milieu en précurseur (1250 µCi/ml). Marquage du noyau. (x 15 000).

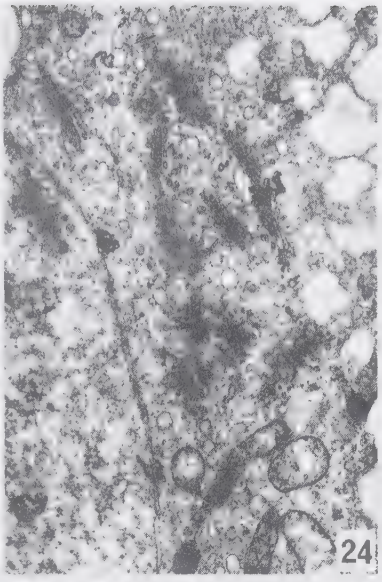
Figure 25 : Après 20 minutes de culture continue en présence du traceur, on observe une forte densité granulaire au niveau des zones golgiennes. Les grains sont principalement retrouvés dans le cytoplasme qui entoure les dictyosomes et dans le système vésiculaire golgien. Le marquage tend à épargner les structures membranaires des saccules. (x 15 000).

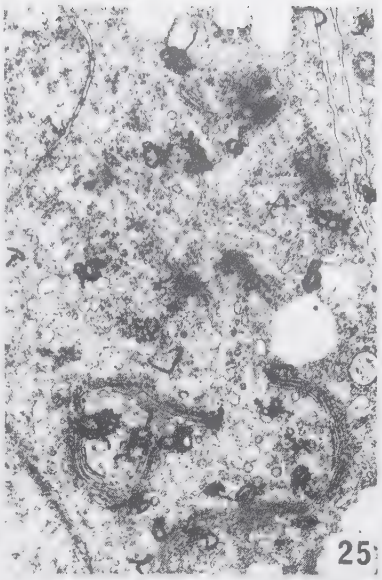
Figures 26 et 27 : Ces illustrations montrent que le pattern autoradiographique obtenu après 20 minutes d'incorporation de fucose-^{3}H (fig. 26) est identique à celui obtenu après une incorporation de 15 minutes de galactose-^{3}H, suivie d'une chasse de 15 minutes (fig. 27). Interprétation dans le texte.(x 15 000 et x 20 000).

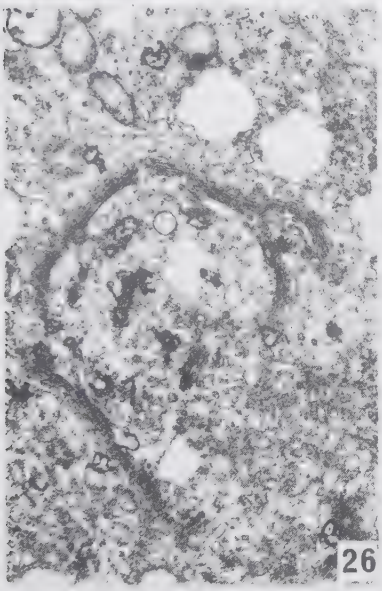
Figure 28 : 30 minutes d'incorporation. L'importance de la concentration en grains d'argent dans les zones golgiennes augmente nettement avec le temps d'incorporation. Noter que la réaction autoradiographique est surtout localisée dans la zone "interne" riche en vésicules des appareils de Golgi, lorsque les sections mettent en évidence la concavité des arcs sacculaires (fig. 25, 26 et 28). (x 15 000).

Figures 29, 30 et 31 : Expérience de chasse après 15 minutes d'incorporation. Le marquage apparaît relativement stable puisque après 8 mn de chasse (fig. 29), 15 minutes de chasse (fig. 30) et même après 45 minutes de chasse (fig. 31), certaines zones golgiennes montrent une forte densité granulaire. (x 15 000, x 15 000 et x 7500).

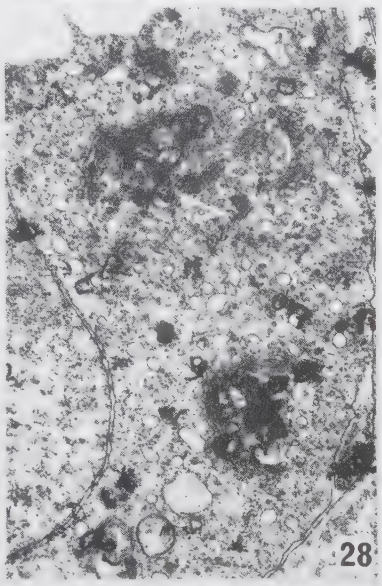

23

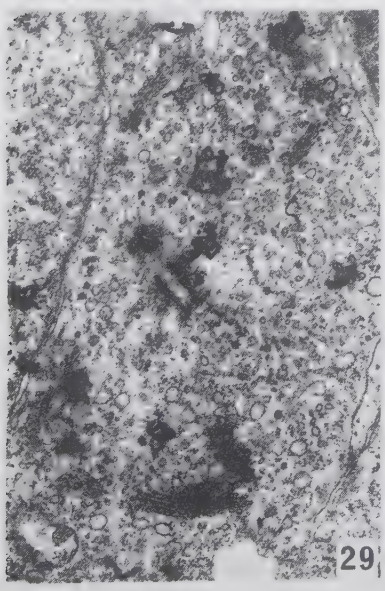

24

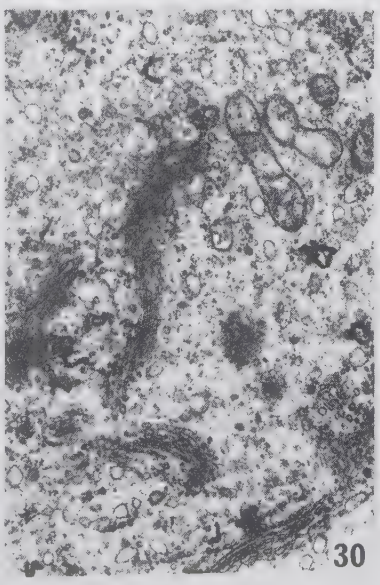

25

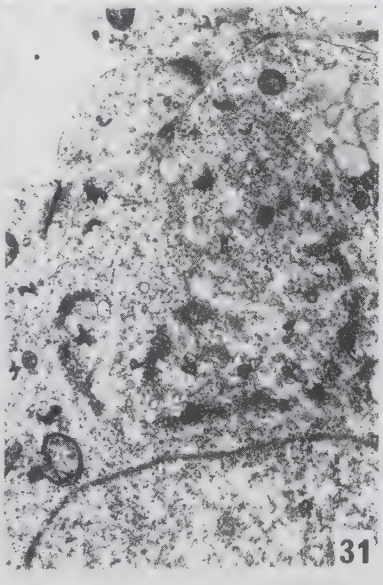

26

27


28


29


30


31

sylations ou, en d'autres termes, que les glycoprotéines synthétisées par les cellules germinales sont plus riches en galactose qu'en fucose (travaux en cours). Nous verrons plus loin que cette impression est confirmée par les observations faites au niveau des membranes et des corps denses.

De plus, il est intéressant de noter que la densité granulaire augmente significativement en fonction du temps d'incorporation ; ceci nous conduit à penser que les processus de renouvellement sont lents et que des mécanismes inertiels engendrent l'accumulation des produits néosynthétisés. Les résultats obtenus au cours de l'expérience de chasse, après une incorporation de 15 minutes, confirment cette interprétation (Pl. XIII, fig. 29, 30 et 31).

En effet, après 8 minutes de chasse, l'image autoradiographique observée sur les sections de dictyosomes demeure importante (Fig. 29). De nombreux grains sont encore retrouvés dans l'environnement des structures sacculaires après 15 minutes de chasse (30e minute de l'expérience, fig. 30) et même après 25 minutes de chasse (Pl. XIV, fig. 35). Il n'est pas rare, après 45 minutes de culture en présence de précurseur froid, de rencontrer des cellules germinales fortement radioactives (Pl. XIII, fig. 31) ; ainsi qu'il l'a été signalé dans la seconde partie de ce travail.

b-/ Observations au niveau de l'espace cytoplasmique, de la membrane plasmique et de la lignée lysosomiale (Pl. XIV).

Dès les 5 premières minutes de culture en présence de fucose-^{3}H, la réaction autoradiographique apparaît dans le cytoplasme, notamment dans certains prolongements pseudopodiaux (Pl. XIV, fig. 32). Ces faits n'ont pourtant pas un caractère de généralité et, à l'intérieur d'une même cellule germinale, des pseudopodes non radioactifs, coexistent avec d'autres qui sont le site d'une forte concentration

P L A N C H E X I V

Incorporation du fucose-^{3}H par les cellules germinales.

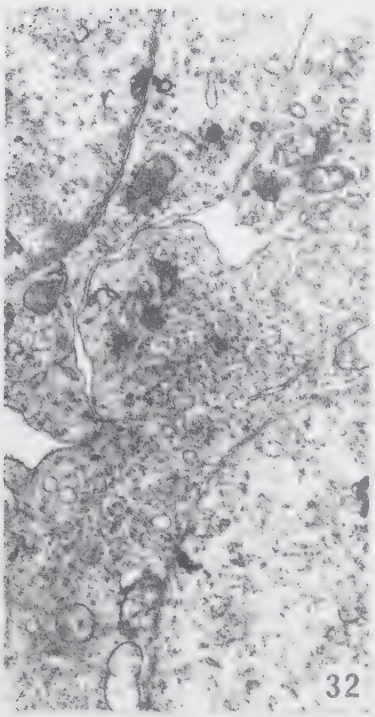
(cytoplasme périphérique, lignée lysosomiale et membrane plasmique).

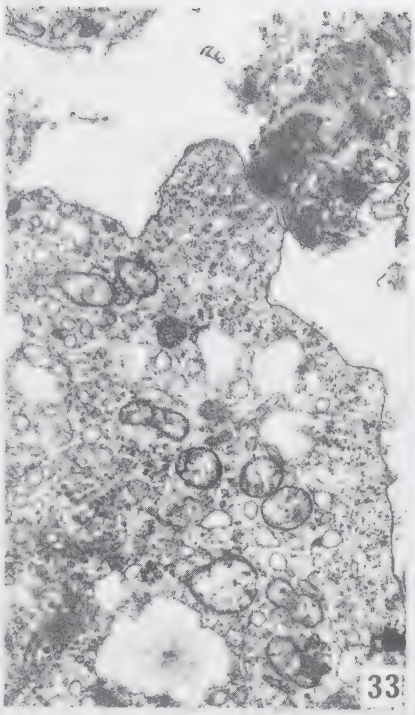
Figures 32 et 33 : 5 minutes d'incorporation. Ces illustrations représentent deux déformations pseudopodiales de la membrane plasmique de la même cellule germinale. Intense incorporation du fucose-^{3}H dans le cytoplasme de l'un des pseudopodes (fig. 32). Noter qu'à ce temps, la zone golgienne ne montre pas de radioactivité (fig. 33): fucosylations directes des glycoprotéines en voie d'achèvement dans le cytoplasme périphérique. (x 15 000).

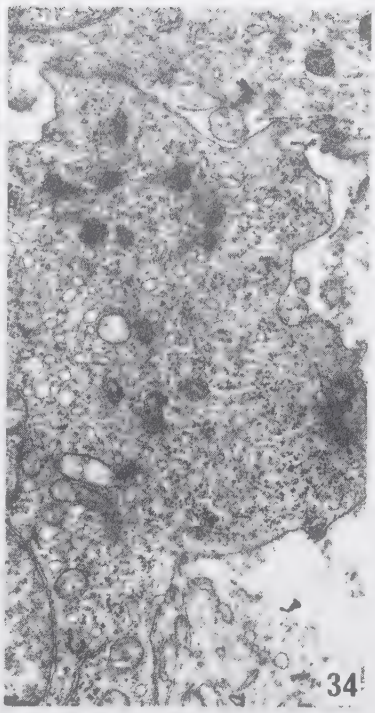
Figure 34 : Incorporation de 17 minutes. Intense marquage du cytoplasme périphérique dans une large déformation du corps cellulaire d'un gonocyte. Noter, à ces différents temps de l'expérience d'incorporation en milieu très radioactif, l'absence de marquage sur la membrane plasmique. (x 11 500).

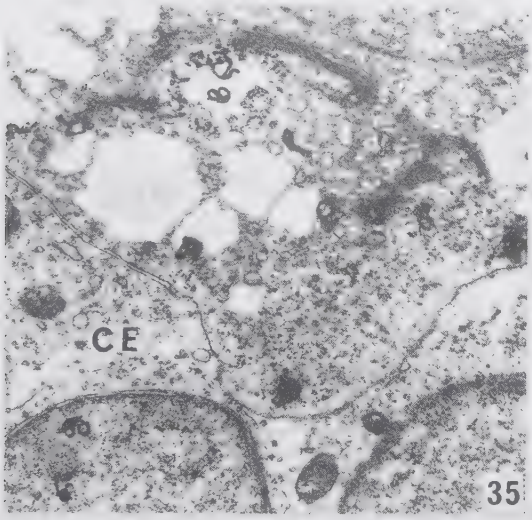
Figures 35 et 36 : 15 minutes d'incorporation suivies de 25 minutes de chasse. La densité granulaire demeure élevée dans la zone golgienne (voir fig. 29 et 30, Pl. XIII). L'activité cytoplasmique a sensiblement décru (fig. 36). Absence de marquage sur la membrane plasmique. Cellules de l'épithélium très faiblement marquées (CE). (x 15 000 et x 11 000).

Figures 37 et 38 : Après 3 heures d'expérience, les grains sont retrouvés sur la membrane plasmique, au niveau des pseudopodes et microvillosités et sur les groupes de corps denses. Remarquer la présence d'une réaction autoradiographique dans le compartiment nucléaire, notamment au niveau de certains nucléoles (fig. 36 et 37). (x 11 500 et x 15 000).

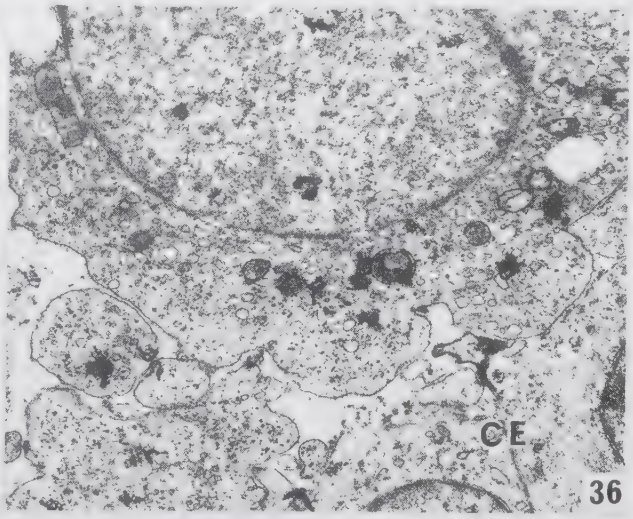

32


33

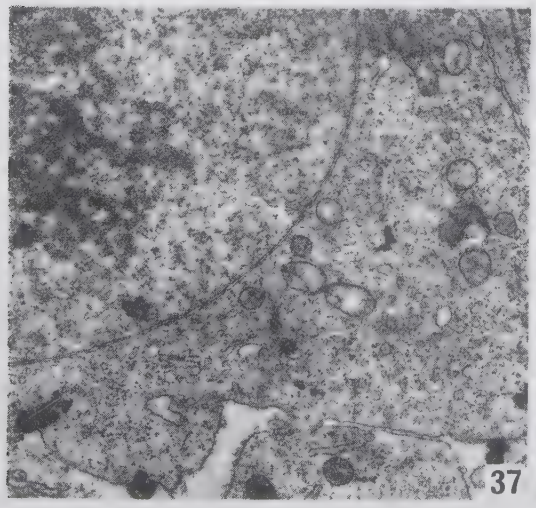

34

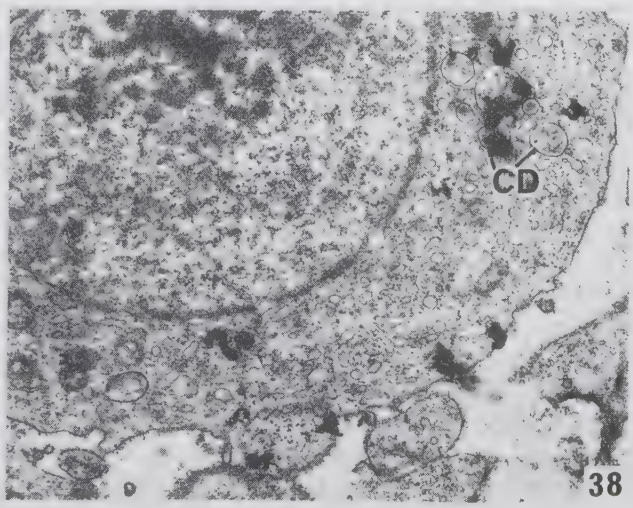


35



36


37



38

en complexes glycoprotéiques marquées (comparer les figures 32 et 33, provenant d'une même cellule migratrice). Le radiotraceur employé permet de révéler électivement des processus métaboliques spécifiques, et d'un point de vue chronologique, de mettre en évidence la régionalisation fonctionnelle du cytoplasme périphérique au niveau des déformations amiboïdes de la membrane. Nous retrouvons donc ici une situation semblable à celle rencontrée lors de l'étude des cellules épithéliales : l'aspect rythmique et discontinu des évènements métaboliques locaux asynchrones limitera le domaine d'extrapolation des données cinétiques globales.

Par ailleurs, on remarquera que dans cette cellule germinale l'appareil de Golgi n'est pas radioactif (comparer avec Pl. XIII, fig. 23) : certains complexes glycoprotéiques sont donc directement fucosylés dans le cytoplasme périphérique, et non dans la sphère golgienne. Après 17 minutes d'incorporation, la radioactivité cytoplasmique s'intensifie, notamment au niveau des prolongements cytoplasmiques (Pl. XIV, fig. 34). Toutefois, on notera qu'après ce long temps d'incorporation la membrane plasmique demeure non marquée.

Au cours de l'expérience de chasse, la situation reste inchangée au niveau des appareils de Golgi, mais l'activité cytoplasmique décroît sensiblement (Pl. XIV, fig. 35 et 36, 25 minutes de chasse). Ce n'est qu'après un long temps de chasse que les grains d'argent apparaissent plus nombreux sur la membrane plasmique et sur les groupes de corps denses (Pl. XIV, fig. 37 et 38, 180 minutes de chasse ; voir aussi D. CUMINGE et R. DUBOIS, 16, fig. 20). Nous notons que l'intensité de la réaction autoradiographique dans ces sites est beaucoup plus discrète que celle observée après une incorporation de galactose-^{3}H.

3.) Conclusion.

Les résultats d'expériences mettant en oeuvre le galactose-^{3}H et surtout le fucose-^{3}H permettent de démontrer l'existence d'une synthèse glycoprotéique dans les cellules germinales migratrices. Les modalités d'incorporation des précurseurs des glycoprotéines sont identiques à celles qui ont été mises en évidence dans les cellules épithéliales : le galactose-^{3}H est principalement mis en place dans les structures sacculaires alors que le fucose-^{3}H est conjugué aux produits galactosylés expulsés dans la zone correspondant au "GERL de Novikoff".

Les appareils de Golgi des cellules germinales sont des sites d'intense glycosylation des complexes glycoprotéiques, mais non des sites exclusifs de ce processus : l'achèvement des glycoprotéines peut également se produire dans l'espace cytoplasmique. En l'absence de données quantitatives suffisamment nombreuses, il n'est pas possible de déterminer la part respective des compartiments golgien et cytoplasmique dans l'élaboration des complexes glycoprotéiques. Les images obtenues avec le galactose-^{3}H suggèrent cependant que l'intensité des galactosylations intragolgiennes est plus marquée dans les cellules germinales, comparativement aux cellules épithéliales.

Mais c'est la comparaison des destinées des substances glycoprotéiques élaborées par les cellules germinales d'une part, et épithéliales d'autre part, qui est la plus intéressante. En ce qui concerne les épithéliums germinatifs, la grande majorité des glycoprotéines sont rapidement renouvelées et destinées à l'excrétion ; une très faible proportion de la radioactivité est retrouvée stabilisée dans les édifices macromoléculaires des membranes. Dans

les cellules germinales, - qui ont rigoureusement subi les mêmes traitements techniques -, les complexes glycoprotéiques sont soumis à un turnover très lent et préférentiellement retrouvés en étroite connexion avec la lignée lysosomiale, le système endomembranaire et les déformations de la membrane plasmique de ces cellules migratrices.

III. - EFFET de la CONCANAVALINE A sur la MIGRATION des CELLULES GERMINALES.

Nous nous proposons d'exposer, sous ce dernier point, les résultats d'expériences qui tendent à préciser le rôle biologique des glycoprotéines élaborées par les cellules épithéliales et les cellules germinales.

Nous avons vu que l'emploi du galactose-^{3}H et du fucose-^{3}H met principalement en relief la physiologie excrétrice des épithéliums germinatifs alors que ces mêmes précurseurs révèlent une intense activité lytique et membranaire des cellules germinales. On peut donc se demander si les substances glycoprotéiques marquées par ces radiotraceurs interviennent, - ou non -, dans les mécanismes de migration chimiotactique des cellules germinales.

1.) Rappel de quelques résultats expérimentaux.

a-/ Essais préliminaires avec la Cytochalasine B.

Dans un premier temps, la Cytochalasine B (I.C.I. Research Laboratories, Alderley Park, Cheshire, England) est éprouvée sur les blastodermes in toto, explantés sur milieu de WOLFF et HAFFEN contenant la substance à des concentrations qui varient de 0,5 à 10 $\mu g.ml^{-1}$. Les diverses concentrations en Cytochalasine dans les milieux sont obtenues par dilution d'une solution-mère de DMSO 50% contenant 500 µg de substance par ml de solution.

Aux faibles concentrations (0,5 à 1 µg.ml^{-1}) la migration des CGP n'est pas perturbée. Les concentrations plus élevées (de 2,5 µg à 10 µg.ml^{-1} entraînent le blocage de la circulation sanguine par arrêt des pulsations cardiaques. Ces fortes concentrations ne peuvent donc être utilisées en culture de blastoderme puisque les résultats sont faussés en raison de l'immobilisation mécanique des CGP dans l'ensemble de l'arbre vasculaire.

Pour pallier cet inconvénient, nous avons éprouvé la Cytochalasine B sur des associations organotypiques in vitro. Une mince lanière du testicule du 13e jour de l'incubation est associée à une jeune région gonadique d'un embryon de 27 à 28 paires de somites (voir Schéma III, page 112). Nous savons qu'après plusieurs heures de culture, de nombreuses spermatogonies quittent le greffon testiculaire et colonisent l'épithélium germinatif proche (R. DUBOIS, 24 et Tableau VIII, page 113). Des concentrations croissantes (de 2,5 µg à 50 µg par ml) de Cytochalasine B ont été appliquées à ce système.

Résultats : Les plus fortes concentrations entraînent des effets cytotoxiques nets, visibles aux microscopes optique et électronique; notamment au niveau des mésenchymes. En aucun cas nous n'avons observé une inhibition de la migration des spermatogonies. Tout au contraire, dans certaines associations, la migration des éléments germinaux est favorisée par la texture des mésenchymes, rendue plus lâche par l'effet de la substance.

Ainsi, les mouvements amiboïdes des spermatogonies embryonnaires ne sont pas inhibés par des concentrations de Cytochalasine B qui détruisent les structures microfilamenteuses (observations en microscopie électronique), arrêtent les battements cardiaques et provoquent dans diverses catégories cellulaires de graves dommages

et lésions à différents niveaux de l'organisation ultrastructurale (membranes plasmiques, mitochondries, noyaux.....).

Le mécanisme d'action et les effets de la Cytochalasine B sur les mouvements et contractions cellulaires demeurent largement discutés (N.K. WESSELLS et all., 75 ; R.D. ESTENSEN et all., 32 et N.K. WESSELLS et all., 76). Les résultats que nous obtenons confirmeraient cependant l'hypothèse selon laquelle la motilité des cellules germinales du Poulet ne serait pas liée au jeu de microfilaments et microtubules (jamais détectés en microscopie électronique) ou à la contractibilité de structures macromoléculaires plus discrètes.

b-/ Relation entre l'intensité de marquage des cellules germinales par le galactose tritié et leur connexion avec un épithélium attractif.

L'autoradiographie de haute résolution montre que le galactose-^{3}H entre dans la composition de macromolécules préférentiellement retrouvées au niveau des pseudopodes et des formations membranaires des cellules germinales en migration.

Afin de donner une dimension statistique à ces observations faites au microscope électronique, nous avons entrepris une étude numérique à l'aide du microscope optique, qui permet une exploration plus large des échantillons expérimentaux.

Après une incorporation de galactose-^{3}H, en culture organotypique, par la jeune région gonadique (embryon de 3 jours d'incubation) et par la jeune gonade morphologiquement indifférenciée (embryon de 5 jours 1/2 d'incubation), nous calculons la proportion de cellules germinales intensément marquées par le radiotraceur.

Résultats : - Dans la jeune région gonadique fortement attractive du 3e jour de l'incubation, cette proportion atteint 47 % dans l'épithélium gauche (434 cellules germinales intensément marquées pour 923 CGP dénombrées) et 40 % dans l'épithélium droit (89 pour 219 CGP dénombrées).

- Dans l'épithélium faiblement attractif de la gonade morphologiquement indifférenciée (R. DUBOIS, 24 ; G. REYNAUD, 65), la proportion de gonocytes primaires ayant intensément incorporé le précurseur est de 23 % (50 sur 214), alors que dans la médullaire de cette même gonade cette proportion est estimée à 6 % (30 sur 474).

Ces chiffres montrent que la proportion de cellules germinales fortement marquées augmente avec l'intensité du champ attractif dans lequel se trouve la population cellulaire étudiée. Il existe donc une relation nette entre l'étroite connexion [population germinale - tissu attractif] et la probabilité, pour une cellule germinale, d'incorporer intensément le galactose-^{3}H. Ce fait suggère l'importance des substances marquées par le précurseur dans la migration chimiotactique et de façon plus précise (microscopie électronique) conduit à attribuer un rôle essentiel aux glycoprotéines et à l'activité membranaire dans les mécanismes de la motilité des cellules germinales.

2.) Effet de la Concanavaline A sur la migration des cellules germinales.

De nombreux travaux portent sur les propriétés mitogènes et agglutinogènes des lectines. Parmi ces substances, la Concanavaline A (phytohémagglutinine extraite du haricot Jacquier, Canavalia ensiformis) présente un intérêt particulier dans le cadre de notre travail. Tout d'abord, elle a une action inhibitrice sur la migration

des cellules tumorales qui, en sa présence, ne peuvent franchir les endothéliums des vaisseaux (S. FRIBERG et all., 37). D'autre part, elle montre une grande affinité pour les hexoses qui ont la configuration des carbones C_3, C_4, C_5 et C_6 propre au D-Glucose et au D-Mannose (I.J. GOLSTEIN et all., 39). Par cette propriété, la Concanavaline A (= Con A) établit des liens spécifiques avec certains résidus glucidiques des chaînes cabohydrates conjuguées aux glycoprotéines. Dans le complexe ainsi formé, les glycoprotéines peuvent perdre certaines de leurs propriétés biologiques. Nous voyons, par ce bref rappel, que l'effet de la Con A sur notre matériel d'étude présente, à plusieurs titres, un puissant intérêt.

a-/ Protocole expérimental (Schéma III).

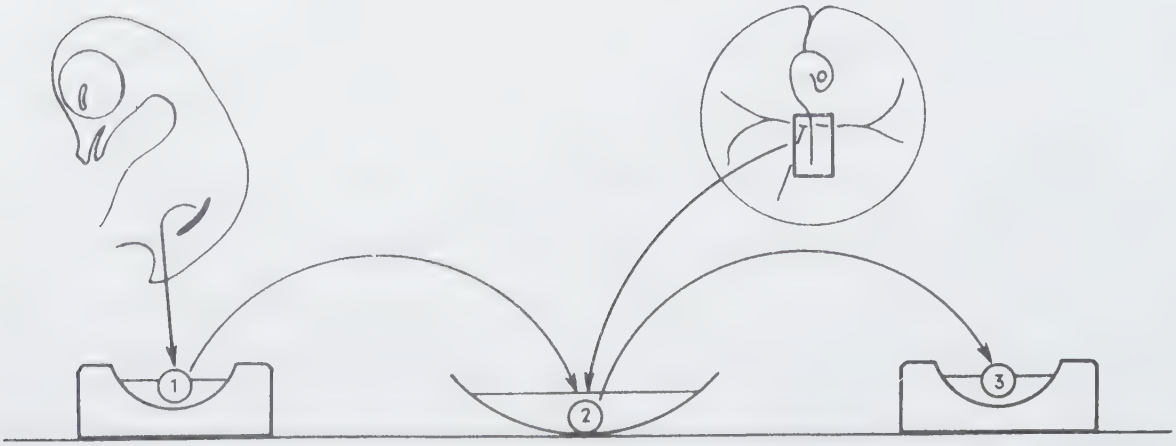
La Con A (Calbiochem) est utilisée, à diverses concentrations, dans les milieux de culture de WOLFF et HAFFEN privés d'extrait d'embryon et dans le liquide de Tyrode.

Les expériences préliminaires ont porté sur les blastodermes in toto cultivés sur des milieux contenant la substance à la concentration de 25 µg ou 50 µg ou 100 µg par ml de milieu. Les blastodermes sont prélevés au stade de 19 à 22 paires de somites et atteignent 28 paires de somites au moment de la fixation (environ 10 heures de culture). Dans tous les cas les crêtes génitales montrent de nombreuses cellules germinales et leur degré de fertilité est le même que celui des témoins.

Devant cet échec nous nous sommes adressés aux techniques d'association in vitro, selon le schéma III.

Les testicules embryonnaires (13 jours d'incubation) sont prélevés et cultivés (1) sur des milieux contenant la Con A

SCHEMA III



(q µg.ml^{-1}), pendant 2 heures. On découpe alors de minces lanières dans ces gonades et chacune d'elles est introduite dans la cavité coelomique gauche de la région gonadique d'un hôte de 28 paires de somites. L'association (2) s'effectue dans le tyrode contenant la Con A à la même concentration (q µg.ml^{-1}) et l'ensemble est transféré sur un nouveau milieu (3) contenant la substance à la concentration de q µg par ml. Pour les associations témoins, nous pratiquons de la même façon, mais en l'absence de Con A.

Unité de mesure de l'intensité de migration : le nombre de spermatogonies qui sortent du greffon et colonisent l'épithélium germinatif associé est fonction de plusieurs variables, entre autres :

- la section et la fertilité du greffon,
- la position du greffon dans l'association,
- l'intensité de l'attraction exercée par l'épithélium,
- le temps de culture de l'association*,
- la longueur de greffon correctement exposée à l'épithélium*,
- la concentration du milieu en Con A*.

Seuls les paramètres marqués d'un (✱) peuvent être contrôlés ou maîtrisés par l'expérimentateur. Nous avons donc exprimé l'intensité de migration (IM) comme nombre de spermatogonies ayant migré par mm de greffon correctement exposé à l'épithélium germinatif, après un temps constant de culture égal à 6 heures. Dans le tableau VIII et le graphique IXa, nous avons donc : $IM = NS_p \cdot mm^{-1}$.

L'influence individuelle des paramètres qui échappent au contrôle de l'expérimentateur peut être nivelée par l'introduction d'une moyenne statistique (IM_m) accompagnée de la déviation standard et calculée à partir d'un nombre suffisant de cas expérimentaux (Tableau VIII). Dans ces conditions, la variation de l'intensité moyenne de migration des spermatogonies (IM_m, Graphique IXa) sera étudiée en fonction de la concentration en Con A, choisie comme variable indépendante.

b-/ Effet inhibiteur de la Con A sur la migration des spermatogonies : résultats.

Les résultats obtenus sur 96 associations font l'objet du Tableau VIII.

TABLEAU VIII

Inhibition de l'intensité moyenne de migration de la population spermatogoniale par la Con A, dans un système in vitro.

Con A ($\mu g.ml^{-1}$)	0	10	25	30	50	100
Nb d'associations	30	3	22	4	20	17
Nb total de migrations	683	38	216	71	161	49
Longueur de greffon (mm)	25,07	1,84	13,74	6,22	21,35	16
$IM_m = Nb_{sp.} \cdot mm^{-1}$	27,3	20,5	15,8	11,3	7,6	3
Déviation standard	± 8	$\pm 1,3$	$\pm 2,7$	$\pm 2,2$	$\pm 3,3$	$\pm 1,6$
Test t de Student		$p \ll 0,01$		$p \ll 0,01$		$p \ll 0,01$
Taux d'inhibition (% des témoins)	0	24,5	42	58,5	72	89

Nous avons fait figurer, sur le Graphique IXa, tous les cas expérimentaux ; chaque point représente donc une association in vitro, soit en absence de Con A soit en présence de cette substance à une concentration donnée. On constate une grande dispersion des points dans chaque groupe expérimental. Cette dispersion, qui est également très marquée dans la série témoin est due à l'influence de nombreux paramètres incontrôlables, ainsi que nous l'avons souligné plus haut. Malgré l'importante fluctuation statistique des mesures individuelles, la représentation graphique en coordonnées semi-logarithmiques montre que les intensités moyennes de migration (IM_m) s'inscrivent approximativement sur une droite. Nous pouvons en conclure que la variation de l'intensité de migration de la population spermatogoniale est une fonction exponentielle décroissante de la concentration en Con A.

Les comparaisons des données obtenues dans les groupes expérimentaux les plus nombreux (0, 25, 50 et 100µg de Con A par ml de milieu) montrent que les différences entre les moyennes sont hautement significatives (Tableau VIII, test t de Student) et confirment la validité de notre interprétation graphique.

Ainsi,la Con A inhibe l'intensité de migration d'une population spermatogoniale soumise au champ attractif selon une loi simple. Il est intéressant de représenter le degré d'inhibition com-

---

Explications des graphiques IX a et b :

IX,a : ordonnées : valeurs logarithmiques des intensités de migration (= IM_m).

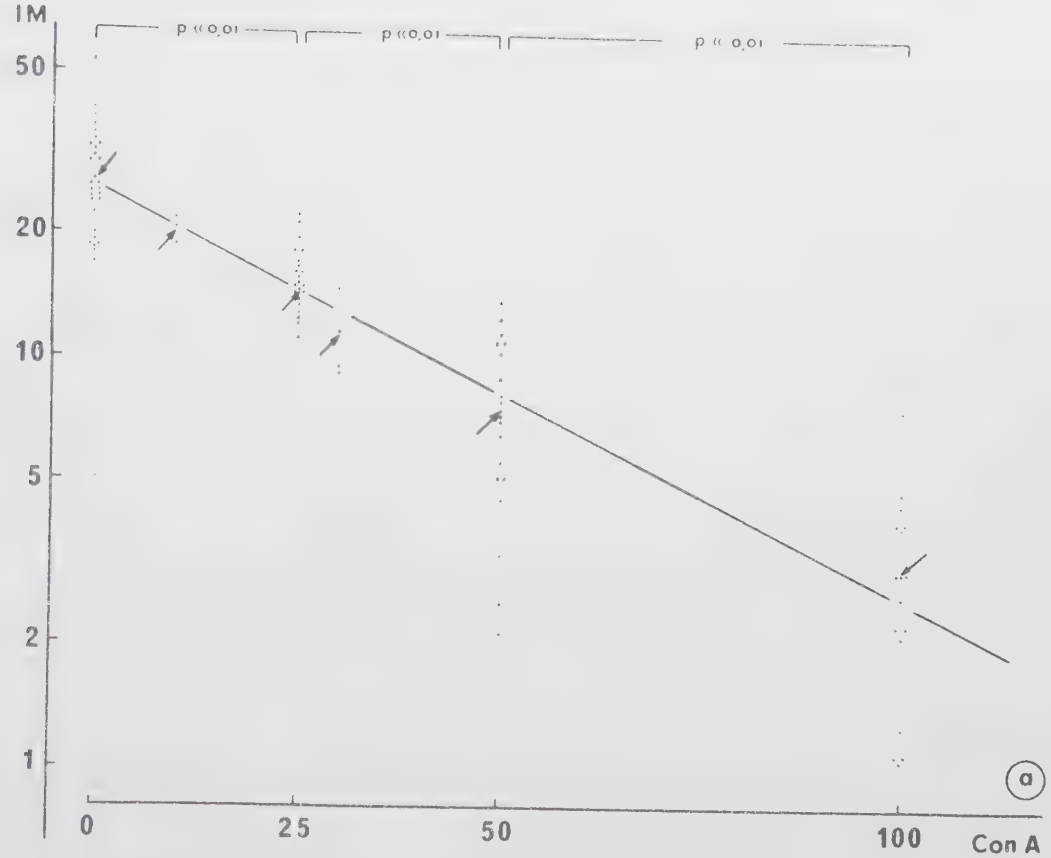
abscisses : concentrations en Con A ($\mu g.ml^{-1}$).

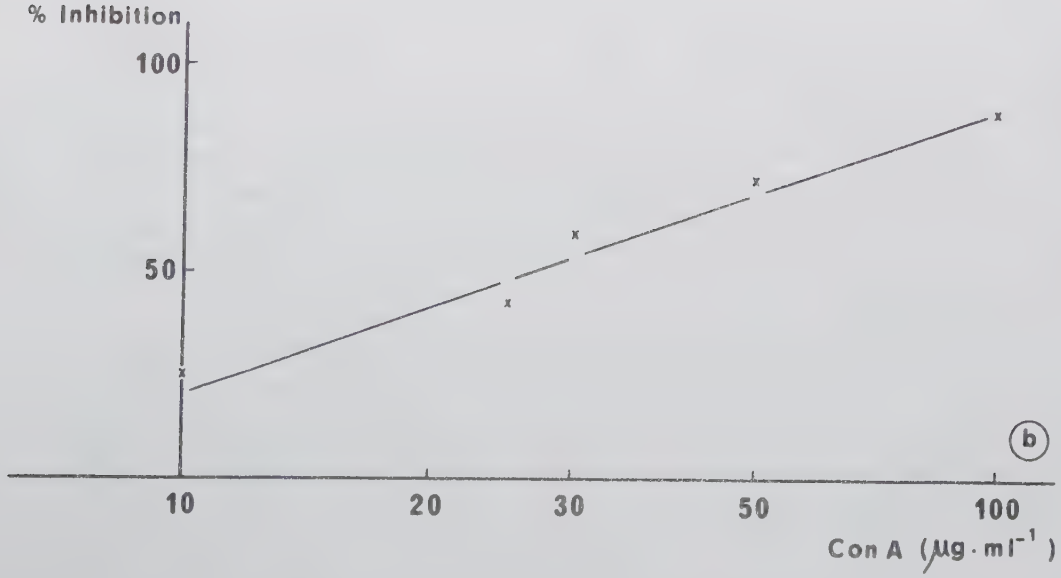
IX,b : ordonnées : valeurs du taux d'inhibition défini comme étant égal à : (IM_m Témoins - IM_m Exp.)/IM_m Témoins et exprimé en %.

abscisses : valeurs logarithmiques de la concentration en Con A entre 10 et 100µg par ml.

G R A P H I Q U E I X

Effet de la Concanavaline A sur la migration des spermatogonies soumises à l'attraction d'un jeune épithélium germinatif, en culture organotypique.





me fonction croissante de la concentration en substance inhibitrice. Le graphique IXb, montre qu'en première approximation, le taux moyen d'inhibition croît linéairement, dans l'intervalle des concentrations utilisées dans nos expériences , en fonction du logarithme de la concentration en Con A.

Il importe enfin de rappeler, sur le plan interprétatif, que l'expression exponentielle de la loi de décroissance de l'intensité de migration met en évidence une hétérogénéité fondamentale de la population spermatogoniale en montrant l'existence d'une distribution spectrale de cette population en fonction de la sensibilité à l'effet inhibiteur de la substance (cf. R. DUBOIS et D. CUMINGE, 31). Ceci nous conduit à définir "une concentration de demi-inhibition". Cette concentration est d'environ 30µg de Con A par ml ; elle inhibe la migration de la moitié de la population spermatogoniale qui migre dans les conditions expérimentales identiques, mais en l'absence de substance.

c-/ Effet inhibiteur de la Con A sur la migration des CGP en culture de blastodermes.

Nos premières tentatives d'inhibition de la migration des CGP dans les blastodermes in toto par des concentrations de Con A atteignant 100 µg par ml de milieu se sont soldées par un échec. Cette même concentration provoque une inhibition très nette (90%) de l'intensité de migration des spermatogonies dans un système in vitro. Cette différence tient-elle à des propriétés différentes des CGP et des spermatogonies, ou est-elle due au protocole expérimental ?
Afin d'apporter une réponse à ces questions, nous avons procédé de la façon suivante :

- les blastodermes sont prélevés aux stades de 19 à 21 somites et immergés pendant 2 minutes dans le tyrode contenant la Con A à la concentration de 250µg.ml^{-1}.

- après cette immersion, les embryons sont transférés sur des milieux gélosés contenant la Con A à la concentration de 250µg par ml. Après une dizaine d'heures de culture, les blastodermes atteignent des stades qui varient entre 26 et 29 paires de somites. Ils sont alors fixés et la fertilité de leurs crêtes génitales est comparée à celle des témoins de mêmes stades.

Les premiers résultats montrent que les nombres moyens de CGP retrouvées sont respectivement 80 et 15 chez les embryons témoins et expérimentés, d'après une statistique qui porte sur une trentaine de cas. Ainsi, dans ces nouvelles conditions expérimentales, la Con A inhibe la migration amiboïde des CGP en transit dans la circulation embryonnaire : de nombreuses cellules germinales sont retrouvées dans le système capillaire qui borde les crêtes génitales, mais elles ne s'installent pas dans les épithéliums germinatifs.

Le nombre moyen de CGP qui colonisent les ébauches génitales serait environ 5 fois inférieur à la moyenne des témoins. Même si les résultats d'expériences actuellement en cours viennent à légèrement modifier ces premières données statistiques, il est d'ores et déjà acquis que la Con A, employée à des concentrations compatibles avec la survie des blastodermes, inhibe fortement la migration chimiotactique des CGP, comme elle inhibe celle des spermatogonies dans un système in vitro.

Sur le plan de la toxicité ajoutons que, contrairement à la Cytochalasine B, la Concanavaline A n'entraîne dans le temps de l'expérience aucune altération des tissus et structures cellulaires décelable aux microscopes optique et électronique.

De plus, l'effet inhibiteur de la Con A est considérablement diminué, - voire supprimé -, lorsque la substance est utilisée à la même concentration (250µg/ml), mais en association avec une prépara-

tion riche en glycoprotéines substituée au tyrode (sérum de Poulain, Laboratoire SORGA), ou en association avec l'α-méthyl-D-mannopyranoside 5.10^{-4} M (I.J. GOLDSTEIN et all., 40).

3.)Conclusion.

Nos résultats montrent que la Concanavaline A, protéine qui se lie spécifiquement aux glycoprotéines, inhibe l'intensité de migration d'une population de spermatogonies soumise au champ attractif d'un jeune épithélium germinatif. La loi d'inhibition est simple. Cet effet inhibiteur s'exerce également sur la population germinale qui colonise les ébauches gonadiques de l'embryon dans les conditions normales du développement.

Si, comme il est probable, l'action de la Con A se situe au niveau des divers complexes glycoprotéiques que nos expériences ont mis en évidence dans notre matériel d'étude, nous devons admettre que ces complexes jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de fertilisation des ébauches génitales.

Dans ce contexte, le fait que la Cytochalasine B n'agit pas sur la migration des éléments germinaux dans les conditions-mêmes qui permettent de démontrer l'action inhibitrice de la Concanavaline A mérite d'être souligné : c'est dans les propriétés de la membrane plasmique plutôt que dans la contractibilité de structures microfibrillaires intracytoplasmiques qu'il convient de localiser le support mécanique de la migration chimiotactique des cellules germinales du Poulet.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats de recherches antérieures ont montré que la migration orientée des CGP du Poulet est déterminée par un mécanisme chimiotactique. L'attraction des épithéliums germinatifs s'exerce également sur les spermatogonies embryonnaires dans un système in vitro.

Nous avons tenté, en mettant à profit les avantages offerts par ce matériel expérimental, de poser les premières bases biochimiques du mécanisme de migration chimiotactique chez les Oiseaux. Dans ce travail, nous avons étudié à l'échelle ultrastructurale et macromoléculaire la fonction excrétrice des épithéliums germinatifs et les propriétés amiboïdes des cellules germinales.

Cependant l'application des méthodes classiques de la biochimie à l'étude sélective des cellules épithéliales d'une part et des cellules germinales d'autre part se heurte à de nombreuses difficultés. C'est pourquoi nous avons fait appel à l'emploi de précurseurs spécifiques marqués combiné à l'autoradiographie ultrastructurale, et à la mise en oeuvre de substances qui, par leurs propriétés particulières, permettent de vérifier la validité d'une hypothèse déterminée.

Les épithéliums germinatifs ont un aspect ultrastructural relativement lâche et constituent une cible facile à une invasion cellulaire. Leur activité sécrétrice et excrétrice est prononcée. Parmi les facteurs biochimiques libérés par ces organes embryonnaires se trouvent notamment des complexes glycoprotéiques couplant le galactose tritié et le fucose tritié.

L'excrétion de ces produits de synthèse se fait par diffusion à travers la membrane plasmique et par le jeu de générations successives de boursouflures qui éclatent à la surface cellulaire. Il s'agit d'une fonction excrétrice de type holo-mérocrine.

Dans le cadre de la théorie chimiotactique, l'intérêt du phénomène de boursouflures lié au processus d'excrétion s'est trouvé renforcé par une observation récente de K.S. RAHIL et R. NARBAITZ (61) d'après lesquels le nombre de protrusions cellulaires serait statistiquement plus important au niveau de l'épithélium de la

glande gauche, réputé le plus attractif.

D'un point de vue topochimique les données morphologiques et cinétiques obtenues dans les cellules épithéliales permettent de reconstituer les étapes successives de la vie intracellulaire des glycoprotéines. En accord avec de nombreux travaux autoradiographiques, nous confirmons le rôle important joué par les appareils de Golgi dans la glycosylation de certaines macromolécules glycoprotéiques. Toutefois, l'analyse de nos résultats quantitatifs n'est pas en faveur du rôle exclusif reconnu généralement aux appareils de Golgi dans ces processus métaboliques et conduit à admettre l'existence d'une seconde voie de biosynthèse glycoprotéique indépendante de l'itinéraire golgien. En ce sens, nos résultats sont plus nuancés que les observations autoradiographiques recueillies dans divers matériels et semblent en meilleure conformité avec les données de la biochimie.

D'autre part, au niveau de la sphère golgienne, la plupart des galactosylations se produisent dans les saccules alors que les fucosylations ont préférentiellement lieu dans le cytoplasme intersacculaire et périgolgien. Le fucose est donc mis en place sur les produits galactosylés d'origine intragolgiennee après leur expulsion hors des saccules des dictyosomes.

Dans les cellules germinales les évènements topochimiques qui marquent les étapes de la biosynthèse glycoprotéique sont similaires de ceux décrits à propos des cellules épithéliales. Mais d'importantes différences ont été constatées en ce qui concerne les destinées diverses de ces glycoprotéines.

Contrairement à ce qui se passe dans la composante épithéliale, la radioactivité liée aux glycoprotéines des CGP n'est pas soumise à un processus de renouvellement rapide. Les macromolécules

intensément marquées par le galactose-^{3}H, - et à un moindre degré par le fucose-^{3}H -, sont retrouvées sur les corps denses et multivésiculaires de la lignée lysosomiale et sur la membrane plasmique après des temps de chasse qui peuvent atteindre plusieurs heures.

Les grains d'argent qui révèlent les complexes glycoprotéiques en connexion avec la membrane et le cytoplasme périphériques ne sont pas uniformément répartis : ils sont concentrés sur les microvillosités, groupés aux endroits où se déroulent les processus de pinocytose, alignés selon les axes des pseudopodes. Parfois, le marquage est localisé à l'extérieur de la cellule germinale et souligne le contour des prolongements cytoplasmiques. En bref, les glycoprotéines synthétisées par les cellules germinales sont principalement destinées à des sites et organites qui semblent en étroit rapport avec les activités membranaire et migratrice des CGP.

Cette interprétation s'appuie à la fois sur les observations fournies par la microscopie électronique et par les données statistiques recueillies dans le champ plus large de l'autoradiographie conventionnelle. En effet, nous savons qu'il existe une corrélation positive entre l'intensité de marquage de la lignée germinale par le galactose-^{3}H et l'influence exercée par des tissus de plus en plus attractifs (médullaire et épithélium cortical de la gonade morphologiquement indifférenciée de 5 jours 1/2 d'incubation, épithéliumsgerminatifs droit et gauche de l'embryon de 3 jours d'incubation, dans l'ordre).

Mais c'est surtout l'effet inhibiteur provoqué par la Concanavaline A qui apporte un argument solide en faveur de notre hypothèse. En établissant des liaisons spécifiques avec les résidus glucosyl et mannosyl des chaînes carbohydrates des glycoprotéines, cette substance perturbe et bloque les mécanismes de migration chimiotactique des cellules germinales. Ceci implique que les com-

plexes glycoprotéiques interviennent de façon déterminante dans un rouage fondamental du mécanisme que nous étudions.

A ce point de nos conclusions, nous voyons que la mise en oeuvre de la Concanavaline A apporte un réel progrès sur le plan biochimique, mais que le problème demeure entier dans ses aspects biologiques. De nombreuses difficultés surgissent lorsque nous essayons de localiser l'action de la substance inhibitrice car plusieurs possibilités doivent être envisagées, qui rendent également compte des perturbations enregistrées par la technique expérimentale. La Con A peut agir tout aussi bien :

1) en inactivant les complexes glycoprotéiques émis par les épithéliums germinatifs attractifs ;

2) en inactivant les diverses glycoprotéines synthétisées par les cellules germinales et métaboliquement indispensables à différents niveaux : utilisation des réserves énergétiques ; formation et fonctionnement des prolongements pseudopodiaux ; action lytique liée à la progression amiboïde.

3) en masquant, sur la membrane plasmique des cellules germinales, les sites récepteurs électivement sensibles au stimulus attractif.

Il s'avère très difficile de choisir, dans l'état actuel de nos travaux, l'une ou l'autre de ces hypothèses. D'après quelques observations préliminaires faites au microscope électronique il semble que la formation de pseudopodes ne soit pas inhibée par la Concanavaline A. S'il devait être confirmé que les cellules germinales ne sont pas immobilisées, mais plutôt <u>désorientées</u>, la cible d'action de la Con A devrait être recherchée au niveau des mécanismes de chimio-guidage, c'est-à-dire au niveau des points 1) et 3) ci-dessus évoqués.

RESUME

Dans le présent travail, nous traitons du problème de la migration chimiotactique des cellules germinales du Poulet en nous plaçant à l'échelle cellulaire et infracellulaire. On sait en effet, par les résultats de travaux antérieurs obtenus dans ce même laboratoire (D. SIMON ; R. DUBOIS) que les CGP libérées dans la zone du "croissant de Swift" rejoignent les ébauches gonadiques, sous l'effet d'une substance diffusible émise par les épithéliums germinatifs.

L'hypothèse d'un déterminisme chimiotactique de la migration des CGP postule que les épithéliums germinatifs attractifs ont une fonction excrétrice et que les CGP sont capables de mouvements autonomes et orientés, en réponse à l'attraction exercée par les ébauches gonadiques.

Nous avons abordé ces aspects du problème, sous la direction du Professeur Et. WOLFF et en collaboration avec R. DUBOIS. Nous avons principalement mis en oeuvre les techniques de culture organotypique en utilisant des molécules radioactives dans des expériences de courts "pulses" suivis de chasse en présence de précurseurs froids. Ces techniques ont été combinées à l'autoradiographie de haute résolution.

Les résultats obtenus peuvent être résumés sous trois rubriques principales qui correspondent aux trois parties de notre mémoire.

I. - Propriétés excrétrices des épithéliums germinatifs attractifs.

1.) L'étude morphologique ultrastructurale de l'épithélium germinatif du troisième jour de l'incubation, a mis en évidence l'aspect syncytial et dissocié de cet organe embryonnaire. Cet aspect est une propriété intrinsèque de l'ébauche gonadique et il est en relation

avec une fonction d'excrétion.

2.) Les résultats d'expériences entreprises avec la leucine-^{3}H montrent la physiologie excrétrice des épithéliums attractifs. Une fraction des complexes protéiques élaborés par les cellules épithéliales est rapidement renouvelée par le jeu de générations successives de boursouflures qui éclatent à la surface des cellules, et par diffusion à travers la membrane plasmique (sécrétion de type holomérocrine).

Il a été possible d'obtenir des renseignements précis sur les lieux de synthèse et les voies de migration intracellulaires des subtances excrétées ou exportables.

Les observations morphologiques et l'analyse cinétique des processus de renouvellement dans le compartiment cytoplasmique permettent de montrer qu'il existe un transfert précoce et rapide de macromolécules radioactives vers le compartiment golgien. Certains dictyosomes élaborent des produits de transformation intragolgiens à partir de précurseurs polypeptidiques d'origine cytoplasmique. Les produits intragolgiens sont eux-mêmes renouvelés, après un bref séjour dans les structures sacculaires golgiennes. Mais du fait de la faible dimension du pool golgien nous n'avons pu établir l'existence d'une filiation entre les complexes protéiques d'origine golgienne d'une part et les protéines exportables excrétées par les épithéliums germinatifs d'autre part. Cependant, quelques observations morphologiques apportent un argument en faveur de cette hypothèse : d'une façon générale le démarquage des structures golgiennes précède l'apparition de la radioactivité dans les boursouflures cellulaires.

3.) Bien que la participation du compartiment golgien à une voie de biosynthèse particulière soit intéressante, elle demeure néanmoins quantitativement limitée. La part la plus importante des substances protéiniques à renouvellement rapide ne transite pas par les appa-

reils de Golgi. Ces substances peuvent être destinées à des processus de turnover interne (hydrolyse in situ) ou/et à une excrétion dans le milieu extracellulaire, sans étape intragolgienne préalable.

II. - Biosynthèse glycoprotéique et activité excrétrice des épithéliums germinatifs.

Afin de préciser la nature biochimique des produits synthétisés et excrétés par les cellules épithéliales, nous avons fait appel à des précurseurs réputés spécifiques de voies métaboliques particulières : au cours de la biosynthèse glycoprotéique, le galactose et le fucose seraient exclusivement incorporés dans les seuls appareils de Golgi(Transglycosylations intragolgiennes).

1.) Les diverses expériences réalisées en présence de galactose-^{3}H démontrent le rôle des appareils de Golgi dans la galactosylation de certaines macromolécules vraisemblablement de nature glycoprotéique. En ce qui concerne la sphère golgienne, le galactose est préférentiellement mis en place au niveau des structures sacculaires. L'analyse cinétique montre que l'intensité des processus d'incorporation du galactose dans les dictyosomes est déterminée par le flux des polypeptides cytoplasmiques à destination intragolgienne.

Le temps de séjour intragolgien des macromolécules marquées par le galactose-^{3}H est du même ordre de grandeur que celui des polypeptides ayant incorporé la leucine-^{3}H. La radioactivité liée à ces deux précurseurs est éliminée du compartiment golgien selon un processus cinétique commun. L'ensemble de ces faits est en accord avec l'hypothèse selon laquelle d'intenses processus de galactosylation des glycoprotéines en voie d'achèvement se produisent dans les saccules golgiens. De plus, quelques observations d'ordre morphologique suggèrent l'existence d'un transfert de ces produits intragolgiens galactosylés vers le cytoplasme apical et les boursouflures à rôle excréteur.

Bien qu'ils soient intenses, les processus de galactosylation qui se produisent dans le compartiment golgien demeurent quantitativement limités en regard des évènements métaboliques qui s'effectuent dans le seul cytoplasme. L'emploi du galactose-^{3}H corrobore donc une observation faite en présence de leucine-^{3}H : une fraction très importante de l'activité cytoplasmique rapidement renouvelée ne transite pas par les appareils de Golgi. Toutefois, en raison des nombreuses conversions biochimiques que peut subir le galactose dans l'économie cellulaire, il n'est pas possible de décider si cette activité est l'expression d'une biosynthèse glycoprotéique indépendante de l'itinéraire golgien.

2.) L'emploi du fucose-^{3}H, précurseur spécifique des glycoprotéines et connu pour sa haute stabilité métabolique, apporte les preuves de l'existence d'une synthèse glycoprotéique dans les épithéliums germinatifs. Des renseignements précis sur les évènements topochimiques intracellulaires de la synthèse glycoprotéique ont également été acquis grâce à ce traceur.

Les observations morphologiques et l'analyse cinétique des données quantitatives montrent que les transfucosylations ont lieu dès les premières minutes de l'expérience d'incorporation au niveau du cytoplasme et un peu plus tardivement au niveau de la sphère golgienne. La réaction autoradiographique due au fucose-^{3}H épargne les structures sacculaires. Elle est localisée dans l'environnement immédiat ou aux extrémités des dictyosomes et correspond à des processus métaboliques différents de ceux qui se déroulent dans le cytoplasme périphérique.

Le taux d'incorporation du fucose dans la sphère golgienne est égal au taux de sortie des produits intragolgiens galactosylés. Ceci signifie que l'intensité d'accrochage du fucose au niveau de la sphère golgienne est déterminée par le flux de sortie des produits de transformation intragolgiens.

Nous avons vu comment les données cinétiques globales complètent les observations morphologiques pour nous renseigner sur les aspects topochimiques des biosynthèses à l'échelle subcellulaire. Dans notre exemple, au niveau du compartiment golgien, les sites de galactosylation sont intra-sacculaires et topographiquement distincts des sites de fucosylation. Le fucose est conjugué aux glycoprotéines galactosylées après leur expulsion hors des appareils de Golgi. Or, ces observations sont en bon accord avec les données actuelles de la biochimie : dans les chaines carbohydrates accrochées au squelette polypeptidique, le galactose est d'abord mis en place en position médiane, alors que le fucose est conjugué plus tardivement en position terminale.

3.) En conclusion à cette seconde partie, nous pouvons dire que nos résultats confirment le rôle important joué par les appareils de Golgi dans la galactosylation des complexes glycoprotéiques. Mais il apparaît que l'appareil de Golgi ne peut être tenu pour un site exclusif de glycosylation. Il existe dans les cellules épithéliales, une seconde voie de synthèse glycoprotéique indépendante de l'itinéraire golgien et quantitativement importante.

Enfin, les observations morphologiques et les résultats numériques montrent que la majorité des complexes glycoprotéiques marqués par le fucose-^{3}H sont soumis à un turnover intense. Une très faible fraction de la radioactivité est retrouvée au niveau des structures stables. Parmi les complexes rapidement renouvelés figurent les substances excrétées (marquage fugace des boursouflures et de la membrane plasmique).

III. - Biosynthèse glycoprotéique et amiboïdisme des cellules germinales. Rôle des glycoprotéines dans la migration chimiotactique.

1.) Aspects ultrastructuraux et histochimiques des cellules germinales. L'observation des cellules germinales au microscope élec-

tronique révèle que ces cellules pénètrent activement dans les ébauches gonadiques attractives par des mouvements amiboïdes et par activité pinocytique et phagocytique.

Le glycogène et les lipides figurés, mis en évidence dans le cytoplasme par des techniques histochimiques appropriées, constituent vraisemblablement des réserves énergétiques indispensables à l' activité migratrice des cellules germinales. La présence d'estérases dans le cytoplasme et surtout dans les gouttelettes lipidiques confirme ce point de vue.

2.) Biosynthèse glycoprotéique et activité amiboïde des cellules germinales. Les modalités d'incorporation du galactose et du fucose sont identiques à celles qui ont été décrites à propos des cellules épithéliales. Au niveau de la sphère golgienne, le galactose est mis en place dans les citernes sacculaires alors que le fucose est conjugué aux complexes galactosylés au moment ou après leur expulsion hors des saccules golgiens. Dans les cellules germinales, les appareils de Golgi jouent donc un rôle important dans l'élaboration de complexes glycoprotéiques. Mais, pas plus que dans les cellules épithéliales, ils ne représentent des sites exclusifs des processus de glycosylation. Certains complexes glycoprotéiques sont galactosylés et fucosylés directement dans le compartiment cytoplasmique, indépendamment des flux métaboliques intragolgiens.

Contrairement à ce qui se passe dans la composante épithéliale, les glycoprotéines élaborées par les cellules germinales sont soumises à un renouvellement lent et ne sont pas destinées à l'excrétion. Après une longue expérience de chasse, les macromolécules marquées par le galactose-^{3}H ou le fucose-^{3}H sont retrouvées en étroite connexion avec la lignée lysosomiale et la membrane plasmique.

Ainsi, dans les cellules épithéliales les glycoprotéines participent presque exclusivement à une fonction d'excrétion, alors que dans les cellules germinales les glycoprotéines sont en étroit rapport avec l'activité lytique et membranaire de ces cellules migratrices.

3.) Effet de la Concanavaline A sur la migration des cellules germinales. Les expériences basées sur l'emploi de la Con A apportent de nouvelles précisions sur la nature du mécanisme qui détermine la migration orientée des cellules germinales;

La Con A, employée à des concentrations qui n'entraînent aucune altération des tissus et structures cellulaires décelables au microscope électronique, inhibe l'intensité de migration d'une population spermatogoniale soumise à l'attraction d'un jeune épithélium germinatif. La loi d'inhibition est une loi statistique : La variation de l'intensité de migration de la population spermatogoniale considérée dans son ensemble est une fonction exponentielle décroissante de la concentration en Con A.

L'effet inhibiteur s'exerce également sur la population germinale qui colonise les ébauches gonadiques de l'embryon de Poulet dans les conditions normales du développement.

Compte tenu des propriétés biochimiques de la Con A, nos résultats montrent que les complexes glycoprotéiques mis en évidence dans le système que nous étudions, jouent un rôle essentiel dans les mécanismes qui dirigent la fertilisation des ébauches gonadiques, chez l'embryon de Poulet. Sur le plan strictement biologique, le point d'action de la substance inhibitrice demeure inconnu.

B I B L I O G R A P H I E

(1) - BEHNKE, O. - 1963 - Helical arrangements of ribosomes in the cytoplasm of differentiating cells of the small intestine of rat foetuses. Exptl. Cell Res., 30, 597-598.

(2) - BEKESI, J. and WINZLER, R. - 1967 - The metabolism of plasma glycoproteins studies on the incorporation of L-Fucose-1-^{14}C into tissue and serum in the normal rat. J. Biol. Chem., 242, 3873-3879.

(3) - BENNETT, G. - 1970 - Migration of glycoprotein from Golgi apparatus to cell coat in the columnar cells of the duodenal epithelium. J. Cell. Biol., 45, 668-673.

(4) - BENNETT, G. and LEBLOND, C.P. - 1970 - Formation of cell coat material for the whole surface of columnar cells in the rat small intestine, as visualized by radioautography with L-Fucose-^{3}H. J. Cell Biol., 46, 409-416.

(5) - BENNETT, G. and LEBLOND, C.P. - 1971 - Passage of fucose-^{3}H label from the Golgi apparatus into dense and multivesicular bodies in the duodenal columnar cells and hepatocytes of the rat. J. Cell Biol., 51, 875-881.

(6) - BOSMANN, H.B., HAGOPIAN, A. and EYLAR, E.H. - 1969 - Cellular membranes : biosynthesis of glycoprotein and glycolipid in HeLa cell membranes. Arch. Biochem. Biophys., 130, 573-583.

(7) - BOUTEILLE, M. - 1971 - Protein renewal in anti-peroxydase antibody forming cells.

I. In vivo incorporation of ^{3}H-Leucine as studied by quantitative ultrastructural autoradiography. Exptl. Cell Res., 66, 465-477.

II. Combination of ultrastructural immuno-cytochemistry and autoradiography in "Pulse-Chase" experiments. Exptl. Cell. Res., 69, 135-147.

(8) - BUSSON-MABILLOT, S. - 1971 - Influence de la fixation chimique sur les ultrastructures.

I. Etude sur les organites du follicule ovarien d'un Poisson Téléostéen. J. Microscopie, 12, 317-348.

(9) - BUSSON-MABILLOT, S. - 1972 - Influence de la fixation chimique sur les ultrastructures.

II. Etude sur les enclaves de nature chimique variée de l'ovocyte d'un Poisson Téléostéen. J. Microscopie, 13, 173-192.

(10) - CARO, L.G. and TUBERGEN, R.P. Van. - 1962 - High resolution autoradiography. J. Cell Biol., 15, 173-199.

(11) - CHOU, J.T.Y. - 1958 - Experiments on the fixation of lipids by osmium tetroxide. Q.J. Microsc. Sci., 99, 285-287.

(12) - CLAWSON, R.C. and DOMM, L.V. - 1963 - Developmental changes in glycogen content of primordial germ cells in chick embryo. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 112, 533-537.

(13) - COFFEY, J.W., MILLER, O.N. and SELLINGER, O.Z. - 1964 - The metabolism of L-Fucose in the rat. J. Biol. Chem., 239, 4011-4017.

(14) - CUMINGE, D. et DUBOIS, R. - 1972 - Etude autoradiographique, au microscope électronique, des ébauches gonadiques du Poulet après une incorporation de Galactose tritié, en culture organotypique. J. Microscopie, 14, 299-326.

(15) - CUMINGE, D. et DUBOIS, R. - 1972 - Les sites d'incorporation du L-Fucose-^{3}H dans les épithéliums germinatifs de l'embryon de Poulet : aspects autoradiographiques et processus cinéti-

ques précoces, en culture organotypique. C. R. Acad. Sc. Paris, 275, 2733-2736.

(16) - CUMINGE, D. et DUBOIS, R. - à paraître - Etude de la biosynthèse de complexes glycoprotéiques par les épithéliums germinatifs chez l'embryon de Poulet.

I. Aspects morphologiques : sites d'incorporation et voies intracellulaires de migration du L-Fucose-^{3}H, en culture organotypique. Ann. Embryol. Morph., à paraître.

(17) - DALLNER, G.,SIEKEVITZ, P. and PALADE, G.E. - 1966 - Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes.

I. Structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte. J. Cell Biol., 30, 73-96.

(18) - DANTCHAKOFF, V. - 1950 - La différenciation du sexe chez les Vertébrés (Colloque C.N.R.S. sur la Differentiation sexuelle chez les Vertébrés). Arch. Anat. microsc. Morph. exp., 39, 185-212.

(19) - DROZ, B. - 1965 - Accumulation de protéines nouvellement synthétisées dans l'appareil de Golgi du neurone ; étude radioautographique en microscopie électronique. C. R. Acad. Sc., Paris, 260, 320-322.

(20) - DROZ, B. - 1966 - Sites de synthèse et migration des protéines dans les cellules hépatiques du Rat ; étude radioautographique en microscopie électronique. C. R. Acad. Sc. Paris, 262, 1654-1656.

(21) - DROZ, B. - 1966 - Elaboration de glycoprotéines dans l'appareil de Golgi des cellules hépatiques chez le Rat ; étude radioautographique en microscopie électronique après injection de galactose-^{3}H. C. R. Acad. Sc. Paris, 262, 1766-1768.

(22) - DROZ, B. et LEBLOND, C.P. - 1963 - Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown

by radioautography. J. Compar. Neurol., 121, 325-346.

(23)-DUBOIS, R. - 1962 - Sur la stérilisation de l'embryon de Poulet par irradiation aux rayons X du croissant germinal extra-embryonnaire. Arch. Anat.micr. Morph. exp., 51, 85-94.

(24)-DUBOIS, R. - 1968 - La colonisation des ébauches gonadiques par les cellules germinales de l'embryon de Poulet, en culture in vitro. J. Embryol. exp. Morph., 20, 189-213.

(25)-DUBOIS, R. - 1972 - Aspects cinétiques de l'activité métabolique des dictyosomes dans les ébauches gonadiques du Poulet, d'après les résultats d'expérience in vitro. C. R. Acad. Sc. Paris, 275, 2057-2060.

(26)-DUBOIS, R. - 1973 - Essai d'interprétation des données cinétiques recueillies dans le compartiment golgien des épithéliums germinatifs du Poulet, en culture organotypique. C. R. Acad. Sc. Paris, 276, 371-374.

(27)-DUBOIS, R. - à paraître - Etude de la biosynthèse de complexes glycoprotéiques par les épithéliums germinatifs chez l'embryon de Poulet.

II. Aspects cinétiques : Données autoradiographiques de haute résolution et topochimie dynamique de la biosynthèse glycoprotéique. Discussion générale. Ann. Embryol. Morph. (à paraître).

(28)-DUBOIS, R. et CUMINGE, D. - 1968 - Sur l'aspect ultrastructural et histochimique des cellules germinales de l'embryon de Poulet. Ann. Histochim., 13, 33-50.

(29)-DUBOIS, R. et CUMINGE, D. - 1971 - Etude cinétique des propriétés excrétrices des ébauches gonadiques de l'embryon de Poulet par l'autoradiographie quantitative au microscope électronique. Exptl. Cell Res., 68, 186-196.

(30) - DUBOIS, R. et CUMINGE, D. - 1971 - Les sites d'incorporation et les voies de migration intracellulaires de la leucine tritiée dans les épithéliums germinatifs de l'embryon de Poulet, en culture in vitro. J. Microscopie, 12, 233-262.

(31) - DUBOIS, R. et CUMINGE, D. - 1974 - Chimiotactisme et organisation biologique : étude de l'installation de la lignée germinale dans les ébauches gonadiques, chez l'embryon de Poulet. Année Biologique, 13, 241-258.

(32) - ESTENSEN, R. D., ROSENBERG, M. and SHERIDAN, J.D. - 1971 - Cytochalasin B : Microfilaments and "contractile" processes. Science, 173, 356-357.

(33) - EYLAR, E.H. - 1965 - On the biological role of glycoproteins. J. Theor. Biol., 10, 89-114.

(34) - FAVARD, P. - 1969 - The Golgi apparatus. in : Handbook of molecular cytology, Lima de Faria A., ed., North Holland Publishing comp. Amsterdam, 1130-1155.

(35) - FEENEY, L. and WISSIG, S. L. - 1972 - A biochemical and radioautographic analysis of protein secretion by thyroid lobes incubated in vitro. J. Cell. Biol., 53, 510-522.

(36) - FORTEZA BOVER, G., HERNANDEZ YAGO, J. y MARTINEZ RAMON, A. - 1973 - Citologia molecular de la biosintesis del colageno. Monografias del Instituto de investigaciones citologicas, Valencia, 130 pages.

(37)-FRIBERG, S., COCHRAN, A.J. and COLUB, S.H. - 1971 - Concanavalin A inhibits tumor cell migration. Nature new Biol., 232, 121-122.

(38) - FROT-COUTAZ, J., LOUISOT, P., GOT, R. et COLOBERT, L. - 1968 - Les sites subcellulaires d'incorporation du 1-^{14}C-L-Fucose dans les glycoprotéines des cellules normales et cancéreuses

en culture in vitro. Experientia, 24, 1206-1207.

(39) - GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E. and MERRICK, J.M. - 1965 - Protein carbohydrate interaction.

I. The interaction of polysaccharides with Concanavalin A. Biochim. Biophys. Acta. 97, 68-76.

(40) - GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E. and SMITH, E.E. - 1965 - Protein carbohydrate interaction.

II. Inhibition studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides. Biochemistry, 4, 876-883.

(41) - GRANBOULAN, P. - 1965 - Comparison of emulsions and technics in electron microscope radioautography. Symp. Intern. Soc. Cell Biol. On the use of radioautography in investigating protein synthesis, Leblond C.P. and Warren K.B. ed., Academic Press, New-York, 43-63.

(42) - HADDAD, A., SMITH, M.D., HERSCOVICS, A., NADLER, N.J. and LEBLOND, C.P. - 1971 - Radioautographic study of in vivo and in vitro incorporation of fucose-^{3}H into thyroglobulin by rat thyroid follicular cells. J. Cell. Biol., 49, 856-882.

(43) - JAMIESON, J.D. and PALADE, G.E. - 1967 - Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell.

I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. J. Cell Biol., 34, 577-596.

II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. J. Cell Biol., 34, 597-615.

(44) - JAMIESON, J.D. and PALADE, G.E. - 1971 - Synthesis, intracellular transport and discharge of secretory proteins in stimulated pancreatic exocrine cells. J. Cell Biol., 50, 135-158.

(45) - KAUFMAN, R.L. and GINSBURG, B. - 1968 - The metabolism of L-Fucose by HeLa cells. Exptl. Cell Res., 50, 127-132.

(46) - KOENIG, H. et DROZ, B. - 1970 - Transport et renouvellement des protéines dans les terminaisons nerveuses. C.R. Acad. Sc., Paris, 270, 2579-2582.

(47) - LE LIEVRE, C. et LE DOUARIN, N. - 1970 - Etude expérimentale du développement de la glande thyroïde chez l'embryon de Poulet. Année Biologique, IX, 285-291.

(48) - LOUISOT, P. et GOT, R. - 1970 - Les sites cellulaires de la biosynthèse des glycoprotéines. Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 455-470.

(49) - LUTZ-OSTERTAG, Y., MEINIEL, R. et LUTZ, H. - 1969 - Action du parathion sur le développement précoce de l'embryon de Poulet. Bull. Soc. Zool. France, 94, 167-176.

(50) - MEYER, D.B. - 1961 - The intraembryonic migration of primordial germ cells in staged chick embryos. Anat. Rec., 139, 314-315.

(51) - MEYER, D.B. and O'RAHILLY, R. - 1961 - The distribution of PAS + material during early morphogenesis in staged chick embryos. Anat. Rec., 139, 253-254.

(52) - MINTZ, B. - 1960 - Formation and early development of germ cells. Symp. Germ Cells and Develop., 1-24 (Inst. Intern. d'Embryologie and Fondazione A. Baselli).

(53) - MOREL, F. et MAETZ, J. - 1960 - Application de la méthode des indicateurs nucléaires à l'étude des problèmes physiologiques. Génie Atomique, Bibliothèque des Sciences et Techniques nucléaires, ed., 1-18.

(54) - MORRE, D.J., MOLLENHAUER, H.H. and BRACKER, C.E. - 1971 - Origin and continuity of Golgi apparatus. in : Origin and Continuity of Cell Organelles, Reinert and Ursprung, ed., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2, 82-126.

(55) - NAKAGAMI, K., WARSHAWSKY, H. and LEBLOND, C.P. - 1971 - The elaboration of protein and carbohydrate by rat thyroid cells as revealed by electron microscope radioautography. J. Cell Biol., 51, 596-610.

(56) - NEUTRA, M. and LEBLOND, C.P. - 1966 - Synthesis of carbohydrate of mucus in the Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose-^{3}H. J. Cell Biol., 30, 119-136.

(57) - NEUTRA, M. and LEBLOND, C.P. - 1966 - Radioautographic comparison of the uptake of galactose-^{3}H and glucose-^{3}H in the Golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolysaccharides. J. Cell Biol., 30 , 137-150.

(58) - NOVIKOFF, A.B. - 1964 - GERL its form and function in neurons of rat spinal ganglia. Biol. Bull., 127, 358 A.

(59) - PELLETIER, G. and PUVIANI, R. - 1973 - Detection of glycoproteins and autoradiographic localization of ^{3}H-Fucose in the thyroidectomy cells of rat anterior pituitary gland. J. Cell Biol., 56, 600-605.

(60) - PISAM, M. et RIPOCHE, P. - 1973 - Renouvellement des glycoprotéines de surface : étude radioautographique de l'épithélium de la vessie de Grenouille. J. Microscopie, 17, 261-282.

(61) - RAHIL, K.S. and NARBAITZ, R. - 1972 - Evolution of the lining bodies in the embryonic chick gonad. J. Embryol. exp. Morph., 28, 133-140.

(62) - RAMBOURG, A. et CHRETIEN, M. - 1970 - L'appareil de Golgi : examen en microscopie électronique de coupes épaisses après imprégnation des tissus par le tétroxyde d'osmium. C.R. Acad. Sc.,Paris, 270, 981-983.

(63) - RAMBOURG, A. et DROZ, B. - 1969 - Incorporation in vitro de la glucosamine-^{3}H et du galactose-^{3}H dans les cellules ganglionnaires spinales et les cellules hépatiques du Rat. Etude radioautographique en microscopie électronique. J. Microscopie, 8, 79 a.

(64) - RAMBOURG, A., BENNETT, G., KOPRIWA, B. et LEBLOND, C.P. - 1971 - Détection autoradiographique des glycoprotéines de l'épithélium intestinal du Rat après injection de fucose-^{3}H. J. Microscopie, 11, 163-168.

(65) - REYNAUD, G. - 1969 - Transfert de cellules germinales primordiales du Dindon à l'embryon de Poulet par injection intravasculaire. J. Embryol. exp. Morph., 21, 485-507.

(66) - REYNOLDS, E.S. - 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208-212.

(67) - ROBINEAUX, R., ANTEUNIS, A. BONA, C. et ASTESANO, A. - 1969 - Localisation par autoradiographie ultrastructurale du galactose-^{3}H dans les lymphocytes transformés. C. R. Acad. Sc., Paris, 269, 1434-1436.

(68) - SCHOENHEIMER, R. - 1949 - "The dynamic state of body constituants". Harvard University Press, 82 pages.

(69) - SIMON, D. - 1960 - Contribution à l'étude de la circulation et du transport des gonocytes primaires dans les blastodermes d'Oiseau in vitro. Arch. Anat. micr. Morph. exp., 49, 93-176.

(70) - SWIFT, C. - 1914 - Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. Am.J. of Anat., 15, 483-516.

(71) - WARSHAWSKY, H., LEBLOND, C.P. and DROZ, B. - Synthesis and migration of proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautographs. J. Cell Biol., 16, 1-23.

(72) - WEINSTOCK, A. and LEBLOND, C.P. - 1971 - Elaboration of the matrix glycoprotein of enamel by the secretory ameoloblasts of the rat incisor as revealed by autoradiography after galactose-^{3}H injection. J. Cell Biol., 51, 26-51.

(73) - WEINSTOCK, A., WEINSTOCK, M. and LEBLOND, C.P. - 1972 - Autoradiographic detection of ^{3}H-Fucose incorporation into glycoprotein by odontoblasts and its deposition at the site of the calcification front in dentin. Calc. Tiss. Res., 8, 181-189.

(74) - WEISS, P. - 1941 - Nerve patterns. The mechanism of nerve growth. Growth Symp., 3, 163-203.

(75) - WESSELLS, N.K., SPOONER, B.S., ASH, J.F., BRADLEY, M.O., LUDUENA, M.A., TAYLOR, E.L., WRENN, J.T. and YAMADA, K.M. - 1971 - Microfilaments in cellular and developmental processes. Science, 171, 135-143.

(76) - WESSELLS, N.K., SPOONER, B.S., ASH, J.F., LUDUENA, M.A. and WRENN, J.T. - 1971 - Cytochalasin B : Microfilaments and "contractile" processes. Science, 173, 358-359.

(77) - WHUR, P., HERSCOVICS, A. and LEBLOND, C.P. - 1969 - Radioautographic visualization of the incorporation of galactose-^{3}H and mannose-^{3}H by rat thyroids in vitro in relation to the stages of thyroglobulin synthesis. J. Cell Biol., 43, 289-311.

(78) - WILSON, B. W., METTLER, M.A. and ASMUNDSON, R.V. - 1969 - Acetyl-cholinesterases and non-specific esterases in developing avian tissues : distribution and molecular weights of esterases in normal and dystrophic embryos and chicks. J. Exp. Zool., 172, 49-58.

(79) - WOLFF, Et. et HAFFEN, K. - 1952 - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Texas Report. Biol. Med., 10, 463-472.

(80) - WOLFF, Et. et SIMON, D. - 1955 - L'explantation et la parabiose in vitro de blastodermes incubés d'embryons de Poulet. L'organisation de la circulation extra-embryonnaire. C.R. Acad. Sc. Paris, 241, 1994-1996.

(81) - ZAGURY, D., UHR, J.W., JAMIESON, J.D. and PALADE, G.E. - 1970 - Immunoglobulin synthesis and secretion.

II. Radioautographic studies of sites of addition of carbohydrate moieties and intracellular transport. J. Cell Biol., 46, 52-63.

(82) - ZILVERSMIT, O.B., ANTENMAN, C. and FISHLER, M.C. - 1943 - On the calculation of turnover time and turnover rate from experiments involving the use of labeling agents. J. Gen. Physiol., 26, 325-340.